

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EL PERIPARTO EN LAS VACAS LECHERAS: BALANCE
ENERGÉTICO, ACTIVIDAD OVÁRICA, SALUD UTERINA Y
EFICIENCIA REPRODUCTIVA**

*Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS*

Autor: MV, Mauricio Javier Giuliodori

Director: MV, MSc, PhD, DECAR, Rodolfo Luzbel de la Sota

Codirector: Lic. Biol, DCBiol, Isabel María Lacau-Mengido

**Lugar de trabajo: Cátedra de Reproducción, Facultad de Ciencias
Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; y
Laboratorio de Regulación Hipofisiaria, Instituto de
Biología y Medicina Experimental (IByME), CONICET**

Miembros del Jurado:

MV, MSc Pathol, Guillermo Ibargoyen, Cátedra de Patología, FCV-UNR

**MV, DCVet, Luis Emilio Fazzio, Cátedra de Clínica de Grandes Animales,
FCV-UNLP**

MV, DCVet, Miguel Atilio Risso, Cátedra de Bioestadística, FCV-UNLP

La Plata, 21 de diciembre de 2011

A mi esposa Laura, a mis dos hijas Muriel y Luisina,

A mis padres Ángel y Olga,

A mis suegros Edmundo y Susana,

Quienes me acompañaron y alentaron en este largo camino...

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar a mi director, el Dr. Luzbel de la Sota, por confiar en mí y darme la oportunidad de investigar en los temas que me apasionan, por discutir críticamente sus ideas sobre cómo realizar estos trabajos, y por acompañarme durante este largo recorrido.
- A mi codirectora, la Dra. Isabel Lacau-Mengido, por el apoyo afectuoso e incondicional, por su gran predisposición y ayuda, y por su lectura crítica y rigurosa a lo largo de todos estos años.
- Al Dr. Carlos Risco, Profesor Visitante del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida y Becario Fulbright en Argentina, por sus discusiones enriquecedoras acerca de cómo desarrollar este trabajo de tesis.
- A la Dra. Damasia Becú-Villalobos por abrirme las puertas de su laboratorio de radio-inmunoensayo, a las Dras. Fabiana Landoni y Cecilia Venturini por prestar desinteresadamente los equipos para las determinaciones de metabolitos, y al Dr. Alejandro Relling por enriquecer el trabajo con sus críticas constructivas.
- A los propietarios, asesores, y veterinarios, especialmente a Valeria Goncalves y a Juliana Van Konijnenburg, y a todo el personal de los establecimientos donde realizamos los experimentos por dejarnos trabajar con sus animales y por la valiosa ayuda recibida en ese momento.
- A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos

Aires por financiar parte de este estudio, y a los laboratorios Tecnofarm SRL y Syntex SA por proveer los productos utilizados con las vacas.

- A los docentes que dictaron los cursos de postgrado que realicé como requisito para cumplimentar los créditos necesarios para el doctorado.
- Al personal de postgrado de mi facultad por la amabilidad que los ha caracterizado todo este tiempo.
- A los miembros del jurado por las correcciones realizadas y por los comentarios y sugerencias que han mejorado la presentación de esta tesis.
- A todos mis compañeros de cátedra por hacer de nuestro lugar de trabajo un espacio agradable, y por la cordialidad y el respeto con que siempre me han tratado.
- A Laura, mi media naranja, por elegir compartir la vida conmigo, por estar siempre a mi lado y por haberme dado a mis dos hijas, Muriel y Luisina.
- A mis padres, Ángel y Olga, por el ejemplo sobre cómo desenvolverse dignamente en la vida y por brindarme la educación necesaria para llegar hasta esta instancia.
- A mis suegros, Edmundo y Susana, por su confianza y por estar siempre dispuestos a dar una mano.

PRÓLOGO

“Pensar es la tarea más difícil, por ello muchos hombres se niegan a hacerlo”

Henry Ford

El presente Trabajo de Tesis se desprende de una línea de investigación sobre la mejora de la eficiencia reproductiva en las vacas lecheras en la que nuestro grupo ha dedicado su esfuerzo durante los últimos años, y es el fruto de un largo período de trabajo realizado con entusiasmo y dedicación. En este sentido, existe un acuerdo generalizado acerca de que para optimizar la producción de leche debe lograrse un intervalo entre partos no mayor a los 13 meses. Se ha descrito que a la mayoría de las vacas se les contamina el útero con bacterias al momento del parto y además que tampoco ciclan en las primeras semanas postparto. Por tanto, ellas deben eliminar esas infecciones y reiniciar sus ovulaciones durante el período de espera voluntaria. De manera que, las que fallan en alguno de estos aspectos atentan contra ese objetivo reproductivo de un parto por año. A pesar de la importancia que tienen estos problemas, y de que la intensificación de la producción lechera en el último lustro los ha agudizado, estos trastornos no han sido debidamente investigados en nuestro país. Por tanto, este trabajo de tesis intenta dilucidar algunos aspectos relacionados con los factores de riesgo involucrados en la presentación de estas enfermedades, bajo condiciones de explotación comercial, para evaluar la eficacia de la utilización de nuevos

métodos de diagnóstico y de tratamiento sobre la producción láctea y la eficiencia reproductiva. En resumen, esta tesis intenta aportar información práctica y útil a fin de mejorar el manejo reproductivo postparto de las vacas lecheras bajo condiciones de explotación comercial.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

1. **Giuliodori MJ**, Delavaud C, Chilliard Y, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, de La Sota RL. High NEFA concentrations around parturition are associated with delayed ovulations in grazing dairy cows. *Livestock Science* 2011; 141:123-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2011.05.007>
2. **Giuliodori MJ**, Lacau IM, Becú-Villalobos D, Risco CA, de la Sota RL. Puerperal metritis in dairy cows: risk factors, efficacy of Ceftiofur therapy and reproductive efficiency. *J Dairy Sci.* 2011 (Enviado).
3. **Giuliodori MJ**, Lacau IM, Becú-Villalobos D, Risco CA, de la Sota RL. 2011. Clinical endometritis: risk factors and reproductive efficiency. *J Dairy Sci.* 2011 (Enviado).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
PRÓLOGO.....	V
LISTA DE PUBLICACIONES PARCIALES.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
LISTA DE TABLAS	XVI
LISTA DE FIGURAS.....	XVIII
RESUMEN	XX
SUMMARY	XXII
 CAPÍTULOS.....	 1
I. INTRODUCCIÓN	1
INTRODUCCIÓN	2
BALANCE ENERGÉTICO	2
REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA POSTPARTO	3
SALUD UTERINA POSTPARTO	5
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	9
HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES	10
 II. REINICIO DE LAS OVULACIONES POSTPARTO EN LAS VACAS LECHERAS	 12
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	13

HIPÓTESIS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
ANIMALES Y TRATAMIENTOS	14
MUESTREO.....	14
CRITERIO DE DIAGNÓSTICO	14
ANÁLISIS DE LABORATORIO	15
METABOLITOS	15
HORMONAS	15
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
VARIABLES CONTINUAS.....	16
VARIABLES BINOMIALES	17
CURVAS COR	17
VARIABLES TIEMPO A EVENTO.....	18
RESULTADOS	18
EFECTOS METABÓLICOS	19
PRODUCCIÓN DE LECHE.....	20
FACTORES DE RIESGO.....	22
ANÁLISIS DE CURVAS COR.....	22
TIEMPO AL REINICIO DE LAS OVULACIONES POSTPARTO.....	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	27
 III. METRITIS EN LAS VACAS LECHERAS	 28
INTRODUCCIÓN	28

OBJETIVOS	30
HIPÓTESIS	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
ANIMALES Y TRATAMIENTOS	31
MUESTREO.....	32
CRITERIO DE DIAGNÓSTICO	33
ENSAYO DE CEFTIOFUR.....	33
ANÁLISIS DE LABORATORIO	33
METABOLITOS.....	33
HORMONAS	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
VARIABLES BINOMIALES	35
CURVAS COR	35
VARIABLES MULTINOMIALES	36
VARIABLES TIEMPO A EVENTO	36
VARIABLES CONTINUAS	37
RESULTADOS	37
PREVALENCIA	37
FACTORES DE RIESGO.....	37
DIAGNÓSTICO	39
EFECTOS REPRODUCTIVOS	41
CURACIÓN	45
EFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE	50
EFECTOS SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO	51

DISCUSIÓN	54
FACTORES DE RIESGO.....	54
DIAGNÓSTICO	55
EFECTOS REPRODUCTIVOS	56
EFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE	56
EFECTO DEL CEFTIOFUR	57
EFECTO DEL BALANCE ENERGÉTICO EN LA CURACIÓN	58
TIEMPO POSTPARTO Y CURACIÓN	59
EFECTOS METABÓLICOS	60
CONCLUSIONES	60
 IV. ENDOMETRITIS CLÍNICA EN LAS VACAS LECHERAS.....	61
INTRODUCCIÓN	61
OBJETIVOS	62
HIPÓTESIS	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
ANIMALES Y TRATAMIENTOS	63
MUESTREO.....	64
CRITERIO DE DIAGNÓSTICO	65
ANÁLISIS DE LABORATORIO	65
METABOLITOS	65
HORMONAS	65
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	66
VARIABLES BINOMIALES	66

CURVAS COR	67
VARIABLES MULTINOMIALES.....	67
VARIABLES TIEMPO A EVENTO.....	68
VARIABLES CONTINUAS.....	68
RESULTADOS	69
PREVALENCIA	69
FACTORES DE RIESGO.....	69
ANÁLISIS DE CURVAS COR.....	70
TIEMPO POSTPARTO Y CURACIÓN	72
EFECTOS REPRODUCTIVOS	73
EFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE	79
EFECTOS SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO	80
DISCUSIÓN	84
FACTORES DE RIESGO.....	84
TIEMPO POSTPARTO Y CURACIÓN	85
EFECTOS REPRODUCTIVOS	86
EFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE	86
EFECTOS METABÓLICOS	87
CONCLUSIONES	88
V. CONCLUSIONES	89
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
BIOGRAFIA PERSONAL	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
BE	Balance energético
BEN	Balance energético negativo
BHB	Ácido β -hidroxi-butírico
CC	Condición corporal
CEF	Ceftiofur
COR	Característica operativa del receptor (ROC, Receiver Operating Characteristics)
d	Días
dpp	Días post-parto
EC	Endometritis clínica
EN _L	Energía neta de lactancia
ES	Error estándar
°C	Grados centígrados
g	Gramos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
h	Horas
IATF	Inseminación artificial a tiempo fijo
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
IGF-1	Factor 1 de crecimiento similar a la insulina
IM	Intramuscular
IPC	Intervalo parto – concepción
kg PV	Kilogramos de peso vivo
LH	Hormona luteinizante
MC	Metritis clínica
Mcal	Megacalorías
MET	Metritis
μ g	Microgramo
min	Minutos
mL	Mililitros
μ M	Micro moles por litro (concentración micromolar)
MMC	Media por mínimos cuadrados (LSM, least square means)
MP	Metritis puerperal
MV	Moco vaginal
Na ₂ EDTA	Etilendiaminotetraacetato disódico (edetato de sodio)
ng/mL	Nanogramos por mililitro
nM	Nano moles por litro (concentración nanomolar)
NP200	Tasa de no preñez a los 200 días postparto
NUP	Nitrógeno ureico plasmático
PA150	Tasa de preñez acumulada a los 150 días postparto
PA300	Tasa de preñez acumulada a los 300 días postparto
TP-IATF	Tasa de preñez a la inseminación artificial a tiempo fijo
P100	Tasa de preñez a los 100 días postparto

P ₄	Progesterona
RIA	Radioinmunoensayo
ROP	Reinicio de las ovulaciones postparto
RP	Razón de probabilidad (OR, odds ratio)
RP+	Razón de probabilidad positiva (LR+, Likelihood ratio positive)
TR	Temperatura rectal
TRI	Tasa de riesgo instantáneo (HR, Hazard ratio)

LISTA DE TABLAS

TABLA

2.1. Empleo de los ácidos grasos no esterificados para predecir la ovulación retrasada en las vacas lecheras en pastoreo.....	23
3.1. Modelo logístico de los factores de riesgo para metritis en vacas Holando Argentino	38
3.2. Modelo logístico del efecto de la metritis sobre la tasa de preñez a los 100 días postparto en vacas Holando Argentino.....	41
3.3. Modelo logístico del efecto de la metritis sobre la tasa de no preñez a los 200 días postparto en vacas Holando Argentino.....	42
3.4. Modelo logístico del efecto del Ceftiofur sobre la curación total de metritis en vacas Holando Argentino.....	45
3.5. Modelo logístico del efecto del Ceftiofur sobre la curación parcial de metritis en vacas Holando Argentino.....	46
3.6. Efectos de la metritis sobre la producción de leche y algunos indicadores del estatus metabólico en vacas Holando Argentino	51
4.1. Modelo logístico de los factores de riesgo de la endometritis clínica en vacas Holando Argentino	69
4.2. Modelo logístico de los efectos de la endometritis clínica sobre el riesgo de inseminación artificial a tiempo fijo en vacas Holando Argentino.....	73
4.3. Modelo logístico de los efectos de la endometritis clínica sobre el riesgo de de preñez a inseminación artificial a tiempo fijo en vacas Holando Argentino	74

4.4. Modelo logístico del efecto de la endometritis clínica sobre las tasa de preñez a los 100 días postparto en vacas Holando Argentino	75
4.5. Modelo logístico del efecto de la endometritis clínica sobre la tasa de no preñez a los 200 días postparto en vacas Holando Argentino	76
4.6. Modelo logístico del efecto de la endometritis clínica sobre el riesgo de rechazo reproductivo en vacas Holando Argentino	77
4.7. Efecto de la endometritis clínica sobre la producción de leche y algunos indicadores del estatus metabólico en vacas Holando Argentino	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

2.1. Valores de condición corporal y de concentración de ácidos grasos no esterificados, de factor 1 de crecimiento similar a la insulina y de leptina en relación al parto y en relación al reinicio de las ovulaciones postparto en vacas lecheras en pastoreo.	21
3.1. Análisis de la eficacia de la temperatura rectal 6 días postparto para el diagnóstico de metritis en vacas Holando Argentino	39
3.2. Análisis de la eficacia de la condición corporal 6 días postparto para el diagnóstico de metritis en vacas Holando Argentino	40
3.3. Análisis de supervivencia para el efecto de la metritis sobre el intervalo parto-concepción hasta los 150 días postparto en vacas Holando Argentino	43
3.4. Curación de metritis en vacas Holando Argentino durante el postparto	48
3.5. Efecto de la metritis sobre la producción de leche en vacas Holando Argentino	50
3.6. Efecto de la metritis sobre la concentración de ácidos grasos no esterificados, β -hidroxi-butilato, nitrógeno ureico plasmático y factor 1 de crecimiento similar a la insulina en vacas Holando Argentino	52
4.1. Análisis de la eficacia de los ácidos grasos no esterificados 14 días preparto para predecir la endometritis clínica en vacas Holando Argentino	70
4.2. Análisis de la eficacia del ácido β -hidroxi-butírico 6 días postparto para predecir la endometritis clínica en vacas Holando Argentino	70
4.3. Evolución del moco vaginal durante el postparto en vacas Holando Argentino	72

4.4. Análisis de supervivencia del efecto de la endometritis clínica sobre el intervalo parto-concepción hasta los 300 días postparto en vacas Holando Argentino	78
4.5. Efecto de la endometritis clínica 41 días postparto sobre la producción de leche en vacas Holando Argentino	79
4.6. Efecto de la endometritis clínica sobre la concentración de ácidos grasos no esterificados y de ácido β -hidroxi-butírico en vacas Holando Argentino	80

TITULO El periparto en las vacas lecheras: balance energético, actividad ovárica, salud uterina y eficiencia reproductiva

PALABRAS CLAVE Vacas periparto, balance energético negativo, metritis puerperal, endometritis clínica, actividad ovárica, eficiencia reproductiva

RESUMEN

Este trabajo de tesis tuvo cuatro objetivos principales: evaluar la relación entre algunos indicadores de balance energético (BE) alrededor del parto y el reinicio de las ovulaciones postparto (ROP), determinar la asociación entre esos indicadores y el riesgo de presentación de metritis (MET) y de endometritis clínica (EC), analizar si el diagnóstico anticipado de MET y su tratamiento con Ceftiofur (CEF) mejoran la curación y la eficiencia reproductiva, y estimar los efectos de estas dos afecciones uterinas sobre la producción de leche y la eficiencia reproductiva en vacas lecheras de producción comercial. Se realizaron 2 experimentos, en el primero se utilizó un diseño completamente aleatorio con mediciones repetidas en el tiempo en el que la vaca fue la unidad experimental. Se evaluaron la condición corporal (CC), y la concentración plasmática de metabolitos y hormonas metabólicas de 20 vacas multíparas desde 2 semanas anteriores a 9 posteriores al parto. Los datos se analizaron con modelos lineales mixtos y con regresiones logísticas y de riesgos proporcionales de Cox. Se encontró que las vacas que padecen de ovulación retrasada poseen menor CC y mayor nivel de movilización grasa durante el periparto, y que la tasa de riesgo instantáneo de tener ROP está en relación directa con la concentración del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1) en el preparto y en relación inversa con los niveles de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en el postparto. Además, se constató que el riesgo de sufrir ovulación retrasada se incrementa a medida que se elevan las concentraciones de AGNE tanto antes como después del parto. En el segundo ensayo se utilizó un diseño completamente aleatorio con mediciones repetidas en el tiempo en el que la vaca fue la unidad experimental. Se evaluaron la CC, las características del moco vaginal (MV) y la concentración plasmática de metabolitos y hormonas metabólicas de 303 vacas primíparas y multíparas desde 2 semanas anteriores a 7 posteriores al parto. Los datos se analizaron con modelos lineales mixtos y con regresiones logísticas, multinomiales y de riesgos proporcionales de Cox. Se determinó que el riesgo de MET es mayor en las vacas primíparas, en las que tienen problemas al parto y en las que poseen altos niveles de AGNE y bajos de IGF-1 durante el preparto; que la terapia con CEF no es efectiva contra la MET, puesto que no afecta la curación clínica, la producción de leche, ni la eficiencia reproductiva; que la tasa de curación guarda relación directa con las concentraciones de insulina, previas y posteriores al parto, y que aumenta con el tiempo postparto, y que es mayor cuando la MET no se acompaña de fiebre. Además, se demostró que la temperatura rectal (TR) y la CC son herramientas diagnósticas precisas para la MET; que los efectos deletéreos sobre la tasa de preñez y el intervalo entre el parto y la concepción (IPC) son causados principalmente por la MET puerperal,

puesto que las vacas con MET clínica se comportan prácticamente igual que las sanas; que la MET posee efectos negativos sobre la producción principalmente al inicio de la lactancia. Asimismo, en el caso de la EC, se demostró que el riesgo es mayor en las vacas que presentan problemas al parto y/o MET y en las que atraviesan un BE más negativo; que las concentraciones de AGNE en el preparto y de B-hidroxibutirato (BHB) en el postparto son útiles para predecir el riesgo de esta enfermedad; que la curación espontánea de EC aumenta con el paso del tiempo durante el postparto; que esta afección causa pérdidas reproductivas por alargar el intervalo a la concepción y por incrementar las chances de rechazo del rodeo, y además que, llamativamente, se acompaña de mayor producción láctea sin afectar el BE de los animales. En conclusión, podría afirmarse que el BE negativo es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la ovulación retrasada, de la MET y de la EC, y que los indicadores de BE (i.e.: AGNE y BHB) son útiles para predecir el riesgo de las vacas de padecer estos trastornos a nivel individual. Además, que los problemas al parto (i.e.: distocia y retención de placenta) desempeñan un rol clave en el desarrollo de las dos afecciones uterinas estudiadas, y que el tratamiento antibiótico con CEF no es efectivo contra la MET. Por último, podría expresarse que la MET, especialmente la puerperal, y la EC poseen efectos deletéreos similares sobre la eficiencia reproductiva, en tanto que ejercen acciones contrapuestas sobre la producción de leche debido a que la primera disminuye marcadamente la producción mientras que la segunda la incrementa levemente.

TITLE The Peripartum in dairy cows: energy balance, ovarian activity, uterine health and reproductive performance

KEY WORDS Peripartum cows, negative energy balance, puerperal metritis, clinical endometritis, ovarian activity, reproductive performance

SUMMARY

The primary objectives of this dissertation were: to assess the relationship between indicators of energy balance (EB) around parturition and the resumption of ovulation postpartum (ROP), to analyze the association between these indicators and the risk for metritis (MET) and clinical endometritis (CE), to determine if an anticipated diagnosis followed by an antimicrobial therapy with Ceftiofur are useful to improve cure rate, milk yield (MY) and reproductive efficiency in dairy cows under commercial conditions. Two experiments were carried out to accomplish these objectives. In the first experiment, a completely randomized design with repeated measures was used. Body condition score (BCS) and blood plasma concentration of metabolites and metabolic hormones were measured in 20 cows from 2 weeks prepartum through 9 postpartum. Mixed model, logistic regression and Cox's regression were run on the obtained data. Cows with delayed ovulation had lower BCS and greater fat mobilization around parturition. The hazard ratio for ROP increased proportionally to IGF-1 prepartum concentrations, and it decreased as postpartum non-esterified fatty acids (NEFA) levels augmented. Also, the risk for delayed ovulation was higher as NEFA increased before and after parturition. In the second experiment, a completely randomized design with repeated measures was used. Body condition score, vaginal mucus (VM) and blood plasma concentration of metabolites and metabolic hormones were evaluated in 303 cows from 2 weeks prepartum through 7 postpartum. Mixed model, logistic regression, multinomial regression and Cox's regression were run on the gathered data. Main findings were: calving problems, high NEFA and low IGF-1 prepartum levels increased the risk for MET; Ceftiofur therapy had no effect on cure rate, MY or reproductive performance; cure rate increased as insulin concentrations were higher, as days postpartum increased, and when MET was not followed by fever. Also, rectal temperature and BCS were accurate tools for the diagnosis of MET. Deleterious effects on reproduction were caused mainly by puerperal MET, because cows having clinical MET showed similar performance to normal herdmates. In addition, MET reduced peak MY. Regarding CE, the risk increased in cows experiencing calving problems, MET and negative EB. NEFA and B-hydroxy-butyrate (BHB) concentrations were useful to predict CE. Spontaneous cure rate increased with days postpartum and CE decreased reproductive performance by extending the interval to conception and by increasing the risk for culling. In addition, cows having CE had greater MY without any effect on EB. In conclusion, NEB is a risk factor for delayed ovulation, MET and CE; indicators of EB are useful to predict the risk for these diseases; calving problems play a vital role in the development of MET and CE; Ceftiofur is not effective against MET; and MET and CE cause deleterious effect on reproductive performance, but only MET decreases MY.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En los tambos el principal objetivo reproductivo es el de alcanzar un intervalo entre partos de 12 a 13 meses. Para ello las vacas deben preñarse nuevamente dentro de los 90 a 120 dpp. Esto último implica que tendrían que reiniciar sus ciclos estrales y ovular, así como restaurar la normalidad estructural y funcional de su tracto reproductivo dentro de ese período. Ambos aspectos son indispensables para lograr la nueva preñez que les asegure la permanencia dentro del rodeo. En este sentido, los problemas relacionados con la actividad ovárica (i.e.: ovulación retrasada y anestro postparto prolongado) y con la salud uterina (i.e.: MET y endometritis) son los trastornos reproductivos más importantes que presentan las vacas lecheras durante el postparto (Foldi y col., 2006; Rhodes y col., 2003; Sheldon y col., 2006). Se ha demostrado que las vacas no ciclan en las primeras semanas postparto (Rhodes y col., 2003) y que a la mayoría se les produce la contaminación del útero con bacterias al momento del parto (Foldi y col., 2006; Sheldon y col., 2006). Por tanto, los animales deberían revertir ambas situaciones, es decir, alcanzar el reinicio de la actividad ovárica postparto y eliminar las infecciones durante el puerperio (Foldi y col., 2006; Rhodes y col., 2003; Sheldon y col., 2006). Las vacas que fallan en reiniciar los ciclos y en librarse de las afecciones uterinas atentarían contra el objetivo reproductivo de tener un intervalo entre partos de 12 a 13 meses. También, se sabe que durante ese período postparto, las demandas energéticas requeridas para mantener las

funciones corporales y, fundamentalmente, para producir leche superan ampliamente la cantidad de energía que pueden obtener de la dieta (Goff y Horst, 1997), motivo por el que los animales entran en un período de BEN. Esto último, hace que les resulte mucho más difícil afrontar y superar con éxito la recuperación postparto de la funcionalidad tanto ovárica como uterina, especialmente durante el pico de producción de leche. En este sentido, los dos problemas que enfrentan los productores lecheros para lograr ese objetivo reproductivo de un parto por año, serían **el retraso del reinicio de los ciclos estrales** (i.e.: ovulación retrasada y anestro postparto) y la **presencia de metritis y endometritis**. Algunos estudios sugieren que estas complicaciones podrían estar ligadas al BEN, pero la información disponible no es abundante y la mayoría de esos trabajos se han realizado en condiciones productivas muy diferentes a las de Argentina.

BALANCE ENERGÉTICO

El BE es un término muy utilizado en nutrición animal que se refiere a la relación entre la cantidad de energía consumida y la requerida tanto para el mantenimiento como para la producción de carne o leche (Bell, 1995; Grummer, 1995). El balance se considera positivo cuando la energía ingerida es superior a la que las vacas lecheras necesitan para cubrir sus demandas. Bajo estas circunstancias, los excesos se acumulan como depósitos de tejido adiposo. El balance es negativo cuando lo que comen no alcanza para satisfacer las necesidades energéticas de mantenimiento y de producción. En estos momentos los animales movilizan los depósitos grasos para cubrir el déficit (Bell, 1995; Cissé y col., 1991; Grummer, 1995). Como resulta muy difícil hacer una

evaluación directa del BE en condiciones de producción animal, se han propuesto y estudiado varios indicadores indirectos (Clark y col., 2005). La CC, que refleja lo acontecido durante las últimas semanas o meses, sería un indicador estático o a largo plazo del BE (Chilliard y col., 1998). Es decir, bajas CC manifestarían que los animales han consumido menos energía de la requerida y por lo tanto, que han atravesado un período prolongado de BEN. Por otro lado, los metabolitos, como son los AGNE, el BHB y la glucosa, y las hormonas metabólicas como la insulina, el IGF-1 y la leptina, actuarían como indicadores dinámicos o a corto plazo del BE (Chilliard y col., 1998; Cissé y col., 1991), puesto que sus cambios de concentración pondrían de manifiesto la relación entre la energía consumida y la requerida, es decir, el BE, en ese preciso momento. Por tanto, si la cantidad de energía consumida es menor que la requerida se observa que la concentración de glucosa disminuye, y por lo tanto, que la de insulina y de IGF-1 también decrecen. Esto último lleva a que aumenten los niveles de AGNE debido a que se movilizan los depósitos grasos, y finalmente a que se incremente la producción hepática de BHB (Grummer, 1995).

REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA POSTPARTO

En las vacas lecheras, el ROP es clave desde el punto de vista reproductivo puesto que las vacas deben preñarse nuevamente dentro de los 90-120 dpp para lograr un intervalo entre partos de 12-13 meses. Además, cuanto antes comiencen a ciclar y a ovular, mayor será la tasa de concepción durante el período de servicio, debido a que la fertilidad de los ovocitos aumenta hasta la tercera ovulación después del ROP (Thatcher y Wilcox, 1973). Para que se reinicien los

ciclos es fundamental que se restablezca la secreción pulsátil de la LH que, a su vez, está controlada por el centro generador de pulsos de la GnRH (Canfield y Butler, 1990). También se considera que el BE sería el principal factor regulador de la secreción hipotalámica de GnRH, y por tanto, el determinante clave del ROP (Canfield y Butler, 1990; Canfield y col., 1990; Canfield y Butler, 1991; Beam y Butler, 1997; Beam y Butler, 1998). En este sentido, un BEN suprimiría la liberación pulsátil de GnRH y así reduciría la frecuencia de los pulsos de LH, con lo que se retrasaría el reinicio de los ciclos postparto (Schillo, 1992, Chagas y col., 2007b). Se ha estudiado que la primera ovulación se produciría unos 19 d después del punto más bajo -nadir- de BE (Beam y Butler, 1999) y además, que cuanto más bajo es ese nadir de BE, más largo es el intervalo entre el parto y el ROP. Así, se ha observado un retraso de 1,25 d por cada 2,38 Mcal de EN_L que desciende el nadir del BE (De Vries y Veerkamp, 2000). De cualquier modo y a pesar de contar con estos datos, se conoce muy poco sobre los mecanismos fisiológicos que relacionan el BE con los centros hipotalámicos (Armstrong y col., 2003; Chagas y col., 2007b). Para esta función se han propuesto algunos metabolitos (i.e.: AGNE, BHB y glucosa) y hormonas metabólicas (i.e.: insulina, IGF-1 y leptina) como señales indicadoras hacia los centros de control superiores (Beam y Butler, 1999; Chagas y col., 2007b; Diskin y col., 2003; Wathes y col., 2003). Por otro lado, se ha demostrado recientemente que si el ROP se produce después de los 35 dpp, se acompaña de menores tasas de preñez y de IPC significativamente más prolongados (Gautam y col., 2010). Además, las vacas que no ciclan al inicio de la temporada reproductiva (aproximadamente 50 dpp, Rhodes y col., 2003) tienen menores chances de ser servidas (Macmillan, 2002) y

de concebir (Darwash y col., 1997) y por lo tanto, mayores probabilidades de ser eliminadas del rodeo (Opsomer y col., 2000). Estos trastornos relacionados al ROP serían de tipo multifactorial (Chagas y col., 2007a; Macmillan, 2000; Rhodes y col., 2003), debido a que su presentación se encontraría influenciada por la edad, la raza y la genética de los animales (Burke y col., 1995; McDougall y col., 1995; McNaughton et al., 2003), por el sistema productivo, la carga animal y el nivel alimenticio (McDougall y col., 1995, Grainger y Wilhelms, 1979), por las enfermedades como la MET y la endometritis (McDougall y col., 1995), y por último, por la CC (Grainger y col., 2003; Roche y col., 2007). Además, se ha informado que la proporción de vacas que ovulan antes de los 40 dpp es mayor entre las que poseen menores niveles de AGNE preparto (Bossaert et al., 2008) y a su vez, que las vacas que ovulan su primer folículo dominante postparto tienen concentraciones de AGNE mucho más bajas que sus compañeras anovulatorias (Kawashima et al., 2007), por lo que el BE podría desempeñar algún rol también en el desarrollo de estos trastornos. La mayoría de los estudios sobre ROP se han realizado en vacas estabuladas y, por tanto, existe poca información sobre lo que sucede en los sistemas pastoriles (Chagas y col., 2006). Recientemente se ha demostrado que la restricción preparto del consumo de pastura prolonga el intervalo al ROP (Burke y col., 2007; Chagas y col., 2007a) mientras que, contrariamente, la suplementación con propilenglicol (Chagas y col., 2007a) o con concentrados lo reducen (Cavestany y col., 2009a,b).

SALUD UTERINA POSTPARTO

Como se mencionó con anterioridad, al momento del parto, a la mayoría de las vacas se les contamina el útero con bacterias y esa infección debería ser

eliminada durante el puerperio (Foldi y col., 2006; Sheldon y col., 2006). Además, se ha observado que presentan inmunosupresión, tanto de tipo celular como humoral, durante un período que se extiende desde 3 semanas previas a 3 semanas posteriores al parto (Sordillo y col., 2009; Waldron, 2011), por lo que los animales deberían afrontar esas infecciones durante un momento en el que su sistema de defensa no es totalmente competente. A su vez, otro aspecto que dificulta la situación es el BEN que atraviesan las vacas, debido a que, como se señaló previamente, las demandas de energía para el mantenimiento y la producción de leche superaran la energía que pueden obtener de la dieta en ese período (Goff y Horst, 1997). Por lo tanto, utilizarían sus depósitos de grasa corporal como fuente de energía, lo que se evidenciaría por los altos niveles circulantes de AGNE. A su vez, estos ácidos se convertirían a BHB en el hígado (Goff y Horst, 1997; Grummer, 1995). En este sentido, la presencia elevada de cuerpos cetónicos en los líquidos corporales (i.e.: sangre, leche y orina) sería considerada como un factor de riesgo para la presentación tanto de MET (Markusfeld, 1984; Markusfeld, 1987) como de endometritis (Reist y col., 2003). Por otro lado, se ha demostrado que las altas concentraciones de AGNE perjudican la función de los linfocitos (Lacetera y col., 2004), lo que sugeriría que la movilización de grasa y por consiguiente las altas concentraciones plasmáticas de AGNE y de BHB, podrían explicar la mayor incidencia de afecciones uterinas en las vacas que experimentan un BEN más marcado (Dubuc y col., 2010; Ospina y col., 2010). Es más, existe un consenso generalizado sobre una interacción entre el sistema nervioso, el endócrino y el inmune que tendría un impacto enorme sobre la presentación y la severidad de las enfermedades, y por tanto, sobre la

productividad animal (Borghetti y col., 2009). En este sentido, en ausencia de procesos inflamatorios los glucocorticoides inhibirían la síntesis de las citoquinas. Por el contrario, durante la inflamación, los tejidos dañados producirían citoquinas que inducirían una resistencia a la insulina, con lo que se establecería un estado catabólico a nivel del organismo (Kelley y col., 2007). Por tanto, es de esperar que muchas vacas fracasasen en la eliminación de las contaminaciones bacterianas postparto debido a que deben limpiar el útero de infecciones durante un período en el que están inmunodeprimidas y además deben reiniciar sus ciclos estrales y ovulaciones postparto durante un período de BEN.

Con relación a la MET y a la endometritis, se sabe que son enfermedades muy costosas para los productores lecheros, debido a los gastos de tratamiento, a la menor producción de leche, a la pérdida de fertilidad, al incremento de los refugos reproductivos y por último, en el caso de la MET debido a las muertes que ocasiona (BonDurant, 1999; Olson y col., 1986; Rajala y Grohn, 1998). La terapéutica de estas afecciones uterinas ha sido un tema muy controvertido, en el que la comparación entre estudios publicados resulta casi imposible, debido a la falta de acuerdo entre los investigadores acerca de los criterios de diagnóstico (MET vs. endometritis), de los regímenes terapéuticos (vía intrauterina vs. IM, mono- vs. multi-dosis), y por último, de los criterios para evaluar el éxito de la curación (temperatura rectal vs. moco vaginal vs. producción lechera vs. eficiencia reproductiva). Además, la mayoría de estos trabajos carece de un grupo control negativo sin tratamiento antibiótico (Hoedemaker, 1998). De cualquier modo, la terapia recomendada para la MET se ha basado en el uso de oxitetraciclina intrauterina acompañado de penicilina sistémica (Foldi y col.,

2006; Olson y col., 1986; Olson y col., 1984). El inconveniente de la oxitetraciclina radica en que la susceptibilidad bacteriana ha disminuido con el paso del tiempo y en el hecho de que es irritante de las mucosas (Sheldon y col., 2004). Estos antibióticos sistémicos también dejan residuos en la leche e incrementan las pérdidas por descarte de la producción. Más recientemente, el tratamiento de elección ha incluido al CEF (1–2 mg/kg vía IM 1 vez/d) y a la penicilina procaínica (21,000 UI/kg IM 2 veces/d) durante 3–5 d (Chenault y col., 2004; Drillich y col., 2001; Smith y col., 1998). En este sentido, el CEF tiene amplio espectro contra los gérmenes que causan la MET y no posee tiempo de retiro de leche (Smith y col., 1998). Además, se ha demostrado que su efectividad resulta similar a la de la terapia recomendada anteriormente (Drillich y col., 2001; Smith y col., 1998). El problema de los tratamientos propuestos en las investigaciones citadas y de otros más recientes (Benzaquen y col., 2007; Drillich y col., 2007), como ya se mencionó, es que no incluyen un grupo control negativo, y por ende, no se ha medido la efectividad real de la terapia antibiótica puesto que no se ha considerado la capacidad de auto-curación de los animales no tratados (Benzaquen y col., 2007). Por tanto, se desconocen totalmente las tasas de curación espontánea y de nuevas infecciones durante el puerperio (Benzaquen y col., 2007).

En síntesis, para que las vacas sean dadas de alta en el postparto y reciban servicio deben haber tenido un puerperio exitoso, es decir, deben tener el útero libre de enfermedades y deben estar ciclando. Lo llamativo es que a pesar de la importancia que poseen estos dos aspectos, no han recibido demasiada atención por las investigaciones recientes y los pocos estudios realizados a nivel mundial se

refieren a animales mantenidos en sistemas productivos totalmente diferentes a los de nuestro país.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación entre los indicadores del BE y la actividad ovárica, la salud uterina y la eficiencia reproductiva en vacas lecheras de producción comercial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos del capítulo II sobre el reinicio de la actividad ovárica en vacas lecheras fueron:

- 1- Estimar algunos indicadores metabólicos de BE en dos momentos, alrededor del parto y del ROP, como posibles señales hacia los centros reproductivos en vacas lecheras en pastoreo.
- 2- Determinar la relación entre estos indicadores de BE, en las semanas anterior y posterior al parto, y el intervalo entre el parto y el ROP.
- 3- Valorar la capacidad de los indicadores de BE para predecir el riesgo de presentación de ovulación retrasada.

Los objetivos del capítulo III sobre la metritis en vacas lecheras fueron:

- 1- Determinar los factores de riesgo de MET tanto clínicos como metabólicos.
- 2- Corroborar la utilidad que poseen los indicadores de BE (a nivel individual) para predecir los casos de MET.
- 3- Comprobar la efectividad diagnóstica de la TR y de la CC para la MET.

- 4- Verificar los efectos de la MET sobre la producción de leche y sobre la eficiencia reproductiva.
- 5- Establecer la eficacia terapéutica del CEF parenteral tanto en la tasa de curación clínica de MET como sobre la productividad de los animales.
- 6- Medir la tasa de curación espontánea (auto-curación) de MET durante el período postparto.
- 7- Cuantificar los efectos de la MET sobre los indicadores del BE.

Los objetivos del capítulo IV sobre endometritis clínica en vacas lecheras fueron:

- 1- Estimar los factores de riesgo clínico y metabólico de la EC en vacas lecheras.
- 2- Determinar el valor predictivo de EC que poseen algunos indicadores de BE a nivel individual de cada vaca.
- 3- Valorar la tasa de curación espontánea de EC durante el período postparto.
- 4- Medir los efectos de la EC sobre la eficiencia reproductiva de las vacas.
- 5- Evaluar los efectos de la EC sobre la producción de leche y sobre algunos indicadores del BE.

HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES

- 1- Un BE más negativo durante el puerperio retrasaría el reinicio de las ovulaciones postparto.
- 2- Un BE más negativo durante el periparto incrementaría la presentación de MET y endometritis, y ambos reducirían la eficiencia reproductiva en las vacas lecheras.

- 3- El diagnóstico y tratamiento temprano (5-7 dpp) de las MET mejoraría la salud uterina y la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras.

CAPÍTULO II

REINICIO DE LAS OVULACIONES POSTPARTO EN LAS VACAS LECHERAS

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos en la producción de leche es el de alcanzar un intervalo entre partos menor al de 380 d. Para ello, es esencial que las vacas retornen a la ciclicidad después del parto. Es más, desde hace tiempo se sabe que cuanto antes comiencen a ciclar mayor será su fertilidad durante el período reproductivo (Thatcher y Wilcox, 1973). A pesar de eso, es extraño que no se cuente con un criterio estandarizado que defina a partir de qué momento se consideran los casos de ovulación retrasada. Recientemente, Gautam y col. (2010b) definieron la ovulación retrasada como caso clínico, basándose en su impacto sobre la performance reproductiva. Según estos autores, cuando ROP se produce después de los 35 d, se acompaña de menores tasas de preñez y por tanto, de IPC significativamente más prolongados. Por otra parte, se ha estudiado que el área pre-óptica hipotalámica está involucrada en el monitoreo del flujo de nutrientes y también en el control del apetito y de la secreción de GnRH (Chagas y col., 2007). A su vez, existe acuerdo generalizado en que el BE sería el principal modulador del generador de pulsos de GnRH (Canfield y col., 1990; Canfield y Butler, 1990, 1991; Beam y Butler, 1997, 1998). Además, se ha mencionado que el ROP ocurriría unos 19 d después del punto más bajo de BE (Beam y Butler, 1999), y que cuanto más bajo es ese valor más se alargaría el intervalo entre el parto y el ROP (de Vries y Veerkamp, 2000).

Dada la importancia del BE y la dificultad de su determinación a campo en rodeos comerciales, se han propuesto algunos estimadores indirectos (Clark y col., 2005). En este sentido, la CC se considera un indicador estático o a largo plazo de BE; mientras que las hormonas metabólicas (IGF-1, insulina y leptina) y los metabolitos (AGNE, BHB y glucosa) se

estiman indicadores dinámicos o a corto plazo del BE (Chilliard y col., 1998). Todos estos indicadores de BE han sido postulados como posibles señales que informarían al generador de pulsos de GnRH acerca del BE del animal (Beam y Butler, 1999; Diskin y col., 2003; Wathes y col., 2003). Sin embargo, a pesar de todos los avances que se han hecho en esta área, aún se desconocen las vías exactas de comunicación fisiológica entre los distintos centros reguladores (Armstrong y col., 2003; Chagas y col., 2007). Por otro lado, se ha descrito que las vacas lecheras en pastoreo pierden peso y CC durante el preparto y que poseen altas concentraciones de AGNE (Cavestany y col., 2005, 2009a,b; Meikle y col., 2004), por lo que sería de esperar que las vacas en pastoreo con pobre CC, alta movilización de grasa (i.e.: alta concentración de AGNE) y baja concentración de IGF-1 padezcan intervalos entre el parto y el ROP más largos, y por ende, que estén propensas a sufrir ovulación retrasada.

1.1. Objetivos

Los objetivos de este capítulo fueron:

- a. Evaluar algunos indicadores metabólicos de BE (i.e.: CC, AGNE, IGF-1 y leptina) en dos momentos, alrededor del parto y del ROP, como posibles señales hacia los centros reproductivos en vacas lecheras en pastoreo.
- b. Determinar la relación entre estos indicadores, en las semanas anterior y posterior al parto, y la probabilidad de padecer ovulación retrasada.
- c. Medir la capacidad de los indicadores de BE de predecir el riesgo de presentación de ovulación retrasada.

1.2. Hipótesis

Las hipótesis más relevantes de este capítulo fueron:

- a. Un BE más negativo alrededor del momento del parto retrasa el ROP.
- b. El riesgo de padecer ovulación retrasada aumenta con un BE más negativo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales y tratamientos

El estudio se realizó en el rodeo de la Escuela Inchausti, de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (35°36' Sur, 60°32' Oeste). Se utilizaron vacas Holando Argentino multíparas (n=20) de parición otoñal. Las vacas secas consumían pasturas mejoradas (mezcla de gramíneas y leguminosas) y eran suplementadas diariamente con silaje de maíz (3 kg/d) a las 16,00 h. Las vacas en lactancia ingerían pasturas mejoradas y recibían 6 kg/d de silaje de maíz después del ordeño vespertino y 4 kg/d de un concentrado comercial (17% de proteína cruda y 1,7 Mcal de EN_L /kg) distribuido en partes iguales durante los ordeños matutino y vespertino (4,00 y 16,00 h).

2.2. Muestreo

Se realizó un muestreo semanal desde la semana -2 antes del parto hasta la 9 después del parto. En cada visita se evaluó la CC con una escala de 5 puntos (Edmonson y col., 1989; Ferguson y col., 1994) y se muestreó sangre por punción coccígea entre las 14,00 y las 15,00 h durante el preparto y entre las 16,00 y las 18,00 h en el postparto (5 a 10 min. antes del ordeño vespertino). Las muestras de sangre se colectaron en tubos de 10 mL con anticoagulante (20 mg de Na_2EDTA) y se mantuvieron en baño de hielo durante el muestreo. Dentro de las 2 h, se obtuvieron los plasmas por centrifugación y se almacenaron a -20°C hasta el momento de los análisis de metabolitos y hormonas. La producción de leche se obtuvo de los registros del establecimiento. El ROP se evaluó mediante la determinación semanal de P_4 . Se utilizó una concentración mayor a 3,18 nM (1 ng/mL) como indicadora de la presencia del cuerpo lúteo y por tanto, del ROP (Harrison y col., 1990; Senatore y col., 1996).

2.3. Criterio de diagnóstico

Se consideró que las vacas padecían de ovulación retrasada cuando tenían el ROP en la semana ≥ 5 (Gautam y col., 2010b).

2.4. Análisis de laboratorio

2.4.1. Metabolitos

Se determinó la concentración plasmática de AGNE con un kit comercial (NEFA-HR(2), Wako Chemicals, Richmond, VA 23237, USA). Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 5,7 y 7,8%, respectivamente.

2.4.2. Hormonas

Las concentraciones de P_4 se midieron mediante RIA con el procedimiento descrito en Díaz-Torga y col. (2001). Brevemente, se utilizaron un anticuerpo provisto por el Dr. Niswender G. D. y una hormona marcada con tritio (Progesterone [1,2,6,7 $^3H(N)$], Dupont NEN, Boston, Massachussets, USA). Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 7,5 y 11,9%, respectivamente. El IGF-1 se determinó por RIA como lo ha descrito Díaz-Torga y col. (2001). Se utilizó un anticuerpo (UB2-495, Hormone Distribution Program, NIDDK) después de la extracción con ácido y etanol y crio-precipitación. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 7,2 y 9,1%, respectivamente. La leptina se determinó mediante RIA con el procedimiento de doble anticuerpo con antisuero específico ovino (Delavaud y col., 2002) y con leptina recombinante bovina (DS Labs, Webster, Texas, USA). Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 6,7 y 9,0%, respectivamente. Todas las iodinaciones para los RIA de las hormonas proteicas se realizaron en el laboratorio de Regulación Hipofisiaria del IByME (Becú-Villalobos y col., 2007).

2.5. Análisis estadístico

En el estudio se utilizó una combinación de dos diseños experimentales, el completamente aleatorio y el de mediciones repetidas (en el tiempo). La unidad experimental fue la vaca. Los datos se muestran como MMC \pm ES. La significación estadística se fijó en $P < 0.05$ y la tendencia en $P < 0.10$. Sólo se discuten los efectos con $P < 0.10$.

2.5.1. Variables continuas

El procedimiento MIXED de SAS 9.1 (SAS, 2003) se empleó para evaluar los cambios en los indicadores de BE durante las semanas relacionadas al parto (Modelo 1) y durante las semanas relacionadas al momento del ROP (Modelo 2). Se incluyeron los efectos fijos del tiempo (semana), de la ovulación retrasada (no vs. si) y de la interacción entre ambos, junto con los efectos aleatorios de la vaca, sobre las variables de respuesta (CC, AGNE, IGF-1 y leptina). Además, se empleó un contraste polinomial para corroborar los efectos lineales, cuadráticos y cúbicos del tiempo (semana). En el modelo 1, se usó otro contraste para comparar los valores preparto con los posparto. Los modelos mixtos de mediciones repetidas se definieron de la siguiente manera:

$$Y_{ijk} = I + T_i + O_j + (T*O)_{ij} + V_k + e_{ijk}, \text{ donde:}$$

Y_{ijk} es el valor observado de la variable respuesta,

I es el intercepto,

T_i es el efecto del tiempo (semana relacionada al parto: -2,...,9 [Modelo 1], y semana relativa al ROP: -3,...,3 [Modelo 2]),

O_j es el efecto de la ovulación retrasada (j : 1=no, 2=si),

$(T*O)_{ij}$ es la interacción,

V_k es efecto aleatorio de la vaca ($k = 1, \dots, 20$), y

e_{ijkl} es el error aleatorio.

El procedimiento MIXED también se usó para estudiar los efectos de la ovulación retrasada sobre la producción al primer control lechero. Este tercer modelo mixto se definió de la siguiente manera:

$$Y_{ijk} = I + O_i + V_j + e_{ij}, \text{ donde,}$$

Y_{ijk} es el valor observado de producción de leche al primer control,

I es el intercepto, O_i es el efecto de la ovulación retrasada (i : 1=no, 2=si),

V_k es efecto aleatorio de la vaca ($k = 1, \dots, 20$), y

e_{ijkl} es el error aleatorio.

En los modelos 1 y 2 se utilizó la estructura de covarianza que arrojó el menor criterio de información de Akaike (Littell y col., 2002).

2.5.2. Variables binomiales

Por otra parte, se empleó el procedimiento Logistic (SAS, 2003) para estudiar los efectos de la CC y de las concentraciones de AGNE, IGF-1 y de leptina, en las semanas anterior y posterior al parto (modelos preparto y posparto) sobre la probabilidad de padecer ovulación retrasada. Los modelos logísticos se definieron de la siguiente manera:

Logit (π) = $I + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4$, donde:

π es el logaritmo de la chance para el evento (i.e.: ovulación retrasada);

I es el intercepto;

b_1 a b_4 son los parámetros de las variables explicativas X_1 a X_4 (CC, AGNE, IGF-1 y leptina) en las semanas anterior y posterior al parto.

En el modelo posparto también se incluyeron el cambio de CC durante todo el período de estudio y la producción (kg/d) al primer control lechero como variables predictivas. La modelización se realizó mediante eliminación manual de variables con un criterio de exclusión de $P > 0.15$.

2.5.3. Análisis de curvas COR

Las variables continuas que permanecieron en los modelos logísticos fueron evaluadas mediante las curvas COR que permitieron determinar los valores de corte para predecir la ovulación retrasada. Estos análisis se realizaron con el SIGMAPLOT 10.0 (Systat, 2006). La curva COR analiza sensibilidad vs. 1 – especificidad. Sensibilidad es la proporción de vacas con ovulación retrasada que tuvieron valores superiores al nivel de corte, mientras que especificidad es la proporción de vacas sin ovulación retrasada que tuvieron valores inferiores al nivel de

corte (Greiner y col., 2000). Como valor de corte se utilizó al punto de la curva COR en el que se alcanzó la mayor sensibilidad y la mayor especificidad combinadas. La interpretación del valor de corte se basó en el ABC. Se considera que un test diagnóstico no es informativo cuando tiene un ABC de 0,5; que es preciso cuando posee un ABC de entre 0,5 y 0,7; que es muy preciso cuando el ABC está entre 0,7 y 0,9; que es altamente preciso cuando el ABC está entre 0,9 y 1,0; y finalmente, que es perfecto cuando el ABC es de 1,0 (Swets, 1988). La RP+ es la probabilidad de que un valor superior al valor de corte provenga de un animal que posteriormente presente el evento (i.e.: ovulación retrasada).

2.5.4. Variables tiempo al evento

El procedimiento PHREG (SAS, 2003) se utilizó para evaluar los efectos de la CC y de las concentraciones de AGNE, IGF-1 y leptina, en las semanas inmediatamente anterior y posterior al parto (modelos preparto y postparto, respectivamente), sobre la TRI de ROP. El modelo de riesgos proporcionales de Cox se definió de la siguiente manera:

$\text{Log } h(t) = \text{Log } h_0(t) + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4$, donde:

Log $h(t)$ es el logaritmo del riesgo del evento (i.e.: ROP) al tiempo t ;

Log $h_0(t)$ es el logaritmo del riesgo basal cuando todas las variables explicativas corresponden a cero (i.e.: intercepto);

b_1 a b_4 son los parámetros de las covariables X_1 a X_4 que representan los valores de CC, AGNE, IGF-1 y leptinas en las semanas anterior y posterior al parto.

3. RESULTADOS

Las vacas normales ($n=15$) alcanzaron el ROP a los $20,5 \pm 1,7$ dpp mientras que las que padecieron de ovulación retrasada ($n=5$) lo hicieron a los $42,0 \pm 3,13$ dpp.

3.1. Efectos metabólicos

Los cambios registrados en los indicadores de BE durante las semanas en relación al parto (modelo 1) se muestran en el panel izquierdo de la Figura 2.1. En este modelo el tiempo (semana) tuvo un efecto significativo ($P<0,01$) sobre la CC, los AGNE y el IGF-1. Ese efecto fue lineal ($P<0,01$) para la CC y los AGNE. Además, los valores de CC fueron más altos en el preparto que durante el postparto ($3,19\pm0,04$ vs. $2,87\pm0,02$, $P<0,01$), y también las concentraciones de IGF-1 fueron mayores en el preparto que en el postparto ($31,67\pm1,65$ vs. $23,47\pm0,98$ nM, $P<0,01$). Las vacas con ovulación retrasada tuvieron CC más bajas que las normales ($2,73\pm0,08$ vs. $2,94\pm0,05$, $P<0,05$), y mayores concentraciones de AGNE que sus compañeras de rodeo ($0,43\pm0,04$ vs. $0,35\pm0,02$ mM, $P<0,10$). La pérdida de CC durante todo el estudio fue de aproximadamente 0,6 puntos. Las concentraciones de AGNE aumentaron en el preparto hasta alcanzar el pico máximo al parto, luego disminuyeron hasta el final del ensayo. Los niveles de IGF-1 disminuyeron en el preparto y luego fluctuaron durante el postparto. Por último, la leptina se mantuvo relativamente constante durante el estudio. Los cambios en los indicadores de BE alrededor del ROP (modelo 2) se muestran en el panel derecho de la Figura 2.1. Hubo un efecto lineal ($P<0,01$) del tiempo (i.e.: semana) sobre la CC y sobre la concentración de AGNE. Las vacas con ovulación retrasada tuvieron menores CC que sus compañeras ($2,59\pm0,10$ vs. $2,99\pm0,06$, $P<0,01$). En la semana en la que se produjo el ROP las vacas con ovulación retrasada tenían menores CC ($2,60\pm0,12$ vs. $2,90\pm0,07$, $P<0,05$), pero mostraban concentraciones similares de AGNE ($0,34\pm0,07$ vs. $0,37\pm0,05$ mM, $P=0,70$), de leptina ($0,17\pm0,05$ vs. $0,19\pm0,03$ nM, $P=0,81$), y de IGF-1 ($21,30\pm4,92$ vs. $19,56\pm3,11$ nM, $P=0,77$) que las compañeras de rodeo.

3.1. Producción de leche

La ovulación retrasada no tuvo efecto sobre la producción de leche puesto que las vacas con y sin la afección mostraron producciones similares ($21,40 \pm 2,47$ vs. $20,92 \pm 1,59$ kg/d, $P=0,87$, para ovulación retrasada y normal, respectivamente).

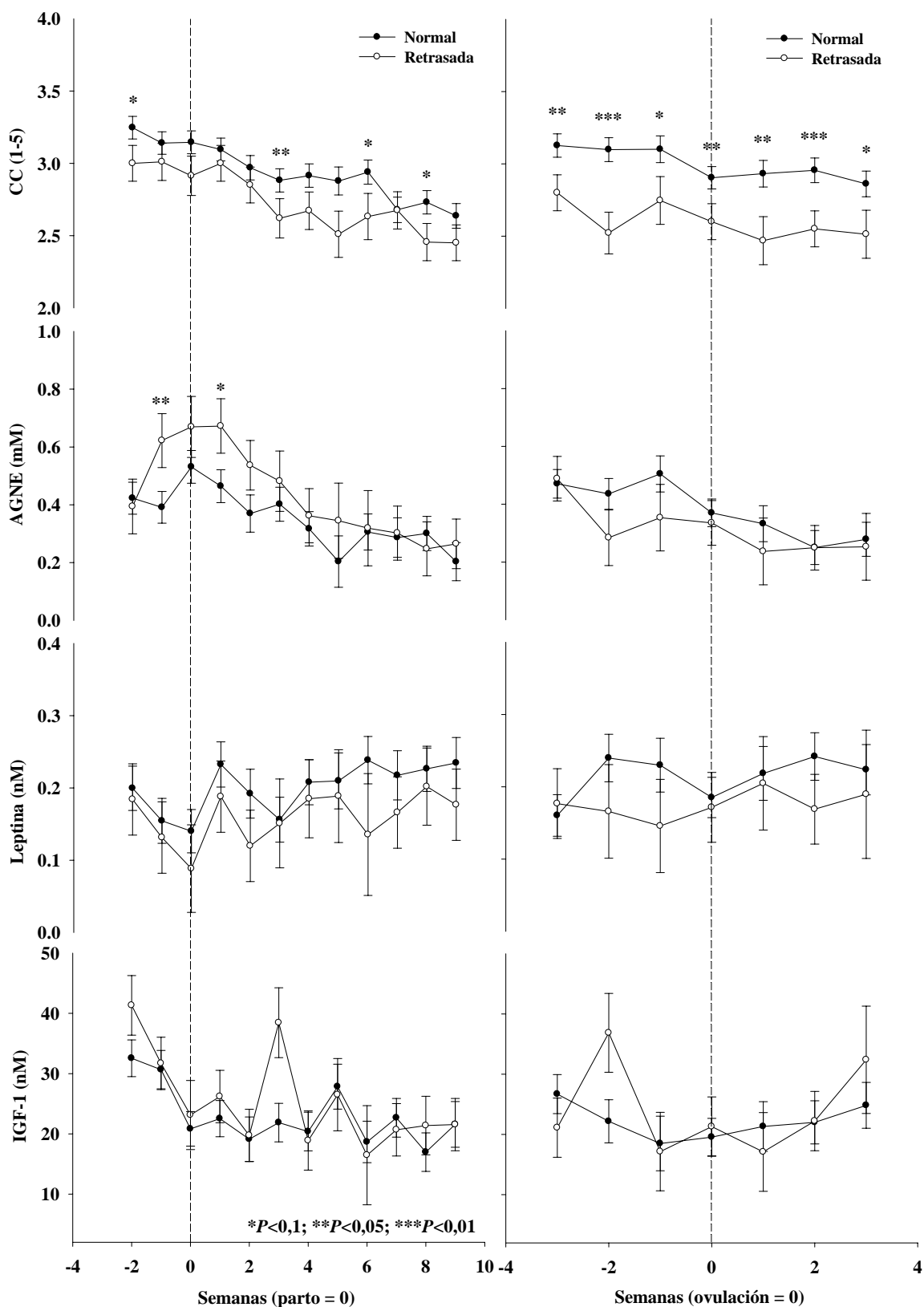


Figura 2.1 Valores (MMC \pm ES) de condición corporal (CC) y de concentración de ácidos grasos no esterificados (AGNE), de factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y de leptina en relación al parto (panel izquierdo) y en relación al reinicio de las ovulaciones postparto (panel derecho) en vacas lecheras en pastoreo (n=20).

3.2. Factores de riesgo

Los modelos logísticos detectaron que la única variable explicativa que advertía el riesgo de ovulación retrasada era la concentración de AGNE, dado que las RP (para los AGNE) fueron de 1,004 (IC 95% = 0,999 – 1,010, $P = 0,099$) en el modelo preparto y de 1,005 (IC 95% = 0,998 – 1,012, $P = 0,088$) en el modelo postparto. Por tanto, el riesgo de ovulación retrasada aumentaba 0,4 y 0,5% por cada μM de incremento en la concentración de AGNE preparto y postparto, respectivamente (La conversión a porcentaje se realizó con la siguiente fórmula: % = $[\text{RP} - 1] \times 100$; Allison, 1995). Entonces, el riesgo de ovulación retrasada crecía entre 40 y 50% por cada 100 μM de elevación en la concentración de AGNE alrededor del momento del parto.

3.3. Análisis de curvas COR

Las curvas COR mostraron que los AGNE son muy precisos para predecir la presentación de ovulación retrasada puesto que las ABC fueron de 0,85 en el preparto y de 0,80 en el postparto. Los valores de corte determinados para los AGNE fueron de 0,39 mM en el preparto y de 0,47 mM en el postparto, con una $\text{RP}+$ de aproximadamente 3 en ambos casos. De modo que las vacas con ovulación retrasada tuvieron 3 veces más chances de haber tenido concentraciones de AGNE superiores a los valores de corte (Tabla 2.1).

3.3.1. Tiempo al reinicio de las ovulaciones postparto

Las regresiones de riesgos proporcionales de Cox mostraron que las únicas variables explicativas que predecían la ovulación eran las concentraciones preparto de IGF-1 ($\text{TRI} = 1,022$, IC 95% = 0,996 – 1,048, $P = 0,097$) y los niveles postparto de AGNE ($\text{TRI} = 0,990$, CI 95% = 0,978 – 1,001, $P = 0,084$). Por tanto, la TRI de que se produzca el ROP aumentaba un 2,2% por unidad de incremento en el IGF-1 (ng/mL) preparto y disminuía un 1% por cada μM de incremento en los AGNE durante el postparto (La conversión a porcentaje se realizó con la siguiente fórmula: % = $[\text{TRI} - 1] \times 100$; Allison, 1995).

Tabla 2.1. Empleo de los ácidos grasos no esterificados (AGNE) para predecir la ovulación retrasada en las vacas lecheras en pastoreo (n=20).

	ABC ⁽²⁾	Análisis de curvas COR ⁽¹⁾				P
		Corte ⁽³⁾	Se ⁽⁴⁾	Sp ⁽⁵⁾	RP+ ⁽⁶⁾	
AGNE preparto ⁽⁷⁾	0,85±0,1	0,39	1,00	0,67	3,00	0,039
AGNE postparto ⁽⁸⁾	0,80±0,1	0,47	1,00	0,64	2,75	0,089

El caso clínico de ovulación retrasada se definió como aquel en que las vacas presentan su primer pico de progesterona (indicativo de ovulación) a partir de la semana 5 postparto.

⁽¹⁾COR: curvas COR (Característica operativa del receptor).

⁽²⁾ABC: área bajo la curva COR (MCM±ES);

⁽³⁾Corte: valor de corte de AGNE (mM);

⁽⁴⁾Se: sensibilidad definida como la proporción de vacas con ovulación retrasada que tuvo concentraciones de AGNE superiores al valor de corte;

⁽⁵⁾Sp: especificidad definida como la proporción de vacas sin ovulación retrasada que tuvo concentraciones de AGNE inferiores al valor de corte;

⁽⁶⁾RP+: razón de probabilidad positiva, es la chance de que una vaca diagnosticada con ovulación retrasada haya tenido concentraciones de AGNE superiores al valor del corte;

⁽⁷⁾AGNE preparto: concentración de ácidos grasos no esterificados durante la semana anterior al parto;

⁽⁸⁾AGNE postparto: concentración de ácidos grasos no esterificados durante la semana posterior al parto.

La diferencia de 0,05±0,17 entre las ABC de las curvas COR para los AGNE (preparto vs. postparto) no fue significativa (Chi cuadrado=0,11, grados de libertad=1, P=0,735).

4. DISCUSIÓN

El presente estudio se focalizó en la evaluación de los indicadores de BE en dos momentos, alrededor del parto y alrededor del ROP, y en su relación con el intervalo entre el parto y el ROP, y con el riesgo de ovulación retrasada. Los principales hallazgos fueron que: 1- las vacas con ovulación retrasada tienen menores CC y mayores concentraciones de AGNE que las compañeras al parto, y que también poseen CC más bajas en el momento del ROP; 2- la TRI de que se produzca el ROP se incrementa a medida que las concentraciones preparto de IGF-1 son más elevadas, mientras que decrece a medida que los valores tanto preparto como postparto de AGNE son más altos; y 3- el riesgo de ovulación retrasada aumenta a medida que crecen las concentraciones de AGNE tanto preparto como postparto. Entonces, a partir del patrón de metabolitos de nuestras vacas proponemos que los AGNE desempeñarían un papel en la comunicación entre el BE y la reproducción. De hecho, ya se ha demostrado en ratas que los

AGNE poseen una acción directa a nivel de los centros hipotalámicos de regulación energética (Lam y col., 2005). Los AGNE ingresan a las neuronas hipotalámicas mediante difusión simple y son esterificados a acil-CoA, de manera tal que el contenido neuronal de acil-CoA es directamente proporcional a la concentración plasmática de AGNE. Un incremento en el contenido intracelular de acil-CoA desactivaría las vías neuronales que impulsan la ingesta de alimento, mientras que por el contrario, una disminución en el contenido de acil-CoA activaría las vías que estimulan el consumo (Lam y col., 2005). Así, según lo visto en el perfil de AGNE en nuestro estudio podría especularse sobre la existencia de un mecanismo similar que relacione los AGNE con los centros reproductivos. Es decir, que concentraciones de AGNE que se encuentren por encima de un determinado nivel sean interpretadas como señales negativas en los centros hipotalámicos y que a su vez induzcan una depresión en el generador de pulsos de GnRH y por tanto, retrasen el ROP. Además, podría especularse acerca de la presencia de un valor umbral para los AGNE, que al ser superado inhibiera los centros reproductivos y retrasase el ROP, pero que por el contrario, al no ser superado liberase los centros y adelantase el ROP. Es más, de acuerdo a lo observado con las curvas COR esos valores de umbral para AGNE podrían estar aproximadamente en 0,39 y en 0,47 mM para las semanas preparto y postparto, respectivamente. Esta hipótesis del umbral de los AGNE se sustentaría en el hecho de que todas las vacas, con y sin ovulación retrasada, tienen su primera ovulación postparto con concentraciones similares de AGNE (y también de IGF-1 y de leptina). Es decir, parecería que los AGNE deberían disminuir por debajo de un determinado nivel crítico para que las ovulaciones pudieran producirse. Ese valor crítico sería alcanzado más rápidamente por las vacas que poseen mayor CC y menores concentraciones de AGNE (ambos indicativos de un BE menos negativo). Por el contrario, las vacas que tienen altas concentraciones de AGNE alrededor del parto (indicativas de un BE más negativo) tomarían más tiempo en alcanzar ese valor crítico y así, demorarían más en presentar el ROP; por ende, estarían más predisuestas a

desarrollar cuadros de ovulación retrasada. Los efectos positivos del IGF-1 preparto sobre la TRI de ROP podrían explicarse por medio de las acciones directas estimuladoras que tiene sobre todo el eje hipotálamo-hipófisiario-gonadal, y que ya han sido demostradas tanto en trabajos in vivo como in vitro (Daftary y Gore, 2005; Diskin y col., 2003). En este sentido, la infusión de IGF-1 ha aumentado el número de receptores de LH y la producción de P_4 en células bovinas de la teca in vitro (Stewart y col. 1995). Además, se ha observado que el IGF-1 estimula la secreción de GnRH a nivel hipotalámico (Daftary y Gore, 2005; Velazquez y col., 2008) indispensable para la producción del pico de GnRH dependiente de estradiol (Naftolin y col., 2007), y que también estimula directamente los gonadotropos a nivel hipofisario para producir LH (Gonzalez-Parra y col., 2001; Li y col., 2011). Finalmente, en otro trabajo se encontró que el IGF-1 es un buen indicador para predecir los días al ROP y la concentración plasmática de P_4 (Francisco y col., 2003).

En nuestro estudio, las diferencias encontradas en los valores de los indicadores indirectos de BE (i.e.: CC y AGNE) se deberían a los niveles de consumo de materia seca y no a la producción de leche, puesto que las vacas con y sin ovulación retrasada producían cantidades similares al inicio de la lactancia. Como se mencionó anteriormente, existe un acuerdo generalizado en que el BE sería el principal determinante del ROP, puesto que controlaría el generador de pulsos de GnRH y, por ende, la pulsatilidad de la LH (Beam y Butler, 1997; Canfield y col., 1990; Canfield y Butler, 1990, 1991). En este sentido, se han propuesto varias hormonas metabólicas e incluso metabolitos como posibles señales indicadoras del BE hacia los centros hipotalámicos (Chagas y col., 2007). Así, la magnitud del tejido graso disponible para movilizar, en casos de BEN, se evalúa por medio de la CC, y los niveles que alcanza esa movilización grasa se miden mediante la concentración de AGNE (Grummer, 1995). Asimismo, se ha demostrado contundentemente que durante los períodos de BEN disminuyen la CC y los niveles de IGF-1 mientras que aumentan los de AGNE (Cissé y col.,

1991). Por tanto, CC preparto más altas estarían reflejando períodos previos de mejor BE, mientras que concentraciones más bajas de AGNE, alrededor del parto, serían indicativas también de un mejor BE pero en ese preciso momento. De ese modo, ambas situaciones llevarían a que las vacas alcancen el ROP mucho más rápidamente durante el postparto, como hemos observado en nuestro experimento. Según la evidencia actual, se sostiene que las vacas deberían parir con una CC de 2,75 a 3,00 y que no tendrían que perder más de 0,5 puntos entre el momento del parto y el del primer servicio (Overton y Waldron, 2004).

Por otro lado, en los últimos años ha crecido el interés por el monitoreo de los AGNE como herramienta de manejo en la producción lechera (Ospina y col., 2010a). Además, su aplicación ha arrojado resultados más que promisorios debido a que altos niveles periparto de AGNE han sido asociados a efectos deletéreos tanto en la faceta productiva como en la reproductiva (Ospina y col., 2010b). En este sentido, durante la última década se han demostrado varias acciones nocivas directas de los AGNE. Por citar algunas, diremos que tienen efectos tóxicos sobre las células de la granulosa en las que disminuyen la proliferación celular y la génesis de esteroides (Vanholder y col., 2004); además, que crean un estado de resistencia a la insulina (la antagonizan) con lo que disminuyen la sensibilidad de los ovarios a las hormonas gonadotrópicas (Lucy y col., 2007). De manera que estas dos vías podrían explicar la relación detectada entre los AGNE y el intervalo de tiempo al ROP. Por tanto, independientemente del mecanismo involucrado en la comunicación del grado de movilización grasa durante el periparto a los centros hipotalámicos que controlan la reproducción, el monitoreo de la concentración de AGNE en las semanas anterior y posterior al parto, podría ser muy útil para predecir la probabilidad de presentación de ovulaciones retrasadas y así merecería que se le preste más atención en futuros estudios poblacionales. En este sentido y de acuerdo a nuestros datos, el riesgo de ovulación retrasada incrementaría 40-50% por cada 100 μM (0,1 mM) de aumento en la concentración de AGNE alrededor del parto, y además, las vacas que

padecen este trastorno es 3 veces más probable que hayan tenido concentraciones por encima del valor umbral. En coincidencia con nuestro trabajo se ha informado que la proporción de vacas que ovulan antes de los 40 dpp es mucho mayor en las que poseen menores niveles de AGNE preparto (Bossaert y col., 2008) y que las vacas que ovulan su primer folículo dominante postparto tienen concentraciones de AGNE mucho más bajas que sus compañeras anovulatorias (Kawashima y col., 2007).

5. CONCLUSIONES

En conclusión, las vacas que padecen de ovulación retrasada poseen menor CC y mayor movilización de grasa durante el periparto. La primera ovulación postparto se adelanta con los aumentos en la concentración preparto de IGF-1 y se atrasa a medida que aumentan las concentraciones postparto de AGNE. Finalmente, el riesgo de ovulación retrasada crece a medida que se elevan las concentraciones de AGNE tanto antes como después del parto.

CAPÍTULO III

METRITIS EN LAS VACAS LECHERAS

1. INTRODUCCIÓN

Las afecciones uterinas tales como MET y endometritis afectan a una gran proporción de vacas lecheras durante el postparto (hasta el 40%) y generan pérdidas productivas y reproductivas muy sustanciales (Fourichon y col., 1999, 2000). A pesar de la gran cantidad de artículos publicados sobre el tema, la comparación entre estudios resulta muy difícil puesto que los investigadores han empleado diferentes definiciones o en algunos casos éstas no han sido muy precisas. Tal es así que durante el 15° Congreso Mundial de Reproducción Animal se instó a unificar los criterios de diagnóstico de estos trastornos para favorecer los avances de las investigaciones (Gilbert, 2004). En respuesta a esta petición, algunos referentes de la especialidad estandarizaron los casos de MET y endometritis (Sheldon y col., 2006). Así, cuando en una vaca se detecta un útero agrandado con MV acuoso y fétido, que se acompaña de fiebre y otros signos sistémicos de enfermedad dentro de los 21 dpp se está ante un caso de MP; mientras que cuando ese útero agrandado y con MV fétido no se acompaña de fiebre y signos sistémicos de enfermedad se está frente a un caso de MC (Sheldon y col., 2006). Estos autores también establecieron que después de los 21 dpp las vacas que presentan un MV con pus que no se acompaña de signos sistémicos de enfermedad debe considerarse la EC, mientras que si las vacas presentan más del

18% de células polimorfonucleares entre 21-33 dpp o más del 10% entre los 34-47 dpp debe diagnosticarse la endometritis subclínica (Sheldon y col., 2006).

La inexistencia de un patrón de oro para el diagnóstico de estas enfermedades uterinas ha hecho que la evaluación del MV sea el procedimiento más útil debido a que la aparición de pus en la vagina se ha correlacionado con la carga de bacterias patógenas dentro del útero (LeBlanc y col., 2002; Williams y col., 2007). Según se ha estudiado y descrito, los problemas al parto tales como la distocia, la retención de placenta y los natimortos (Correa y col., 1993; Gröhn y col., 1990) resultan los principales factores de riesgo de la MET. Además, se ha mencionado el bajo consumo de materia seca (Urton y col., 2005; Uzzey y col., 2007) y más recientemente, los altos niveles preparto de AGNE como factores predisponentes para la enfermedad (Dubuc y col., 2010; Ospina y col., 2010). En relación al tratamiento de MET, existe un acuerdo generalizado en que es necesario tratar a las vacas con MP, fundamentalmente debido al riesgo de muerte de los animales. Pero por el contrario, los criterios empleados para evaluar el éxito terapéutico han sido muy poco consistentes entre los diferentes autores (LeBlanc, 2008). El tratamiento de elección incluye al CEF (1-2 mg/kg IM, 1 vez/d) y a la penicilina procaínica (21,000 UI/kg IM, 2 veces/d) durante 3-5 d (Smith y col., 1998; Drillich y col., 2001; Chenault y col., 2004). Con el uso de estos tratamientos se ha logrado una remisión de la fiebre de cerca del 70% pero no así del MV fétido que se ha reducido a aproximadamente el 40% (Drillich y col., 2001; Chenault y col., 2004). Además, como en la mayoría de los estudios se han usado controles positivos, faltaría información sobre la tasa de auto-curación de los animales que no reciben terapia antibiótica. En estos trabajos

tampoco se ha analizado la eficiencia productiva y reproductiva de los animales tratados, por tanto, se desconoce el efecto del tratamiento sobre estos aspectos y sobre la presentación de enfermedades relacionadas como la endometritis (LeBlanc, 2008).

1.1. Objetivos

Los objetivos de este capítulo fueron:

- a. Evaluar los factores de riesgo de la MET.
- b. Estimar el valor que poseen los indicadores de BE para predecir los casos de MET.
- c. Valorar la efectividad de la TR y de la CC como herramientas en el diagnóstico de los casos de MET.
- d. Determinar los efectos de la MET sobre la producción de leche y sobre la eficiencia reproductiva.
- e. Medir la eficacia terapéutica del CEF en la curación clínica y en la productividad de los animales.
- f. Analizar la tasa de auto-curación de MET durante el postparto.
- g. Cuantificar los efectos de la MET sobre los indicadores del BE.

1.2. Hipótesis

Las hipótesis más relevantes de este capítulo fueron:

- a. El riesgo de padecer MET en vacas lecheras aumenta con los problemas al parto y con un BE más negativo.
- b. El CEF incrementa la tasa de curación de MET y mejora la eficiencia reproductiva.
- c. La MET perjudica la eficiencia reproductiva en las vacas lecheras.

- d. La MET afecta la producción de leche y el estatus metabólico de las vacas lecheras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales y tratamientos

El estudio se realizó en un tambo comercial ubicado en Ordoñez, provincia de Córdoba, Argentina (32°49' Sur, 62°52' Oeste) en el que se evaluaron vacas Holando Argentino (n=303) de parición otoñal. Durante el preparto (tres semanas anteriores a la de la fecha probable de parto), los animales se mantuvieron en corrales en los que se los monitoreaban los signos de parto. En los primeros tres dpp se alojaron en el corral de vacas recién paridas; el cuarto dpp, si estaban saludables, se trasladaron al rodeo en lactancia. Allí, se las alimentaba cuatro veces por día con raciones totalmente mezcladas y formuladas para cubrir los requerimientos establecidos por el NRC (2001). Se realizaron tres ordeñes / d (04:00, 12:00 y 20:00 h). Después de un período de espera voluntario de 40 d, a las vacas que tenían el alta reproductiva postparto se las incluyó en el siguiente protocolo de IATF: el d 41±3 se les insertó un dispositivo intravaginal con 1g de P₄ (DIB[®], Syntex SA) y se les administraron 50 µg de lecirilina (GnRH, Gonasyn[®], Syntex SA); el d 48±3 se les removió el dispositivo y se les suministraron 150 µg de cloprostenol (PGF, Ciclase[®], Syntex SA); el d 50±3 se les administraron 50 µg de GnRH, y el d 51±3 se les efectuó la IA (+16 h). El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación rectal aproximadamente 35 d después de la IATF. La historia productiva y reproductiva de todas las vacas involucradas en el estudio se obtuvo de los registros del establecimiento.

2.2. Muestreo

Se determinó mediante el uso del programa WinEpiscope 2.0 (Thrusfield y col., 2001) que en este estudio se requeriría de un tamaño de muestra de 151 animales por grupo de tratamiento para lograr detectar una diferencia de 15% entre las dos proporciones (grupo 1= 40% y grupo 2= 25%), con un nivel de confianza del 95% y un poder del 80%.

Las vacas del experimento se muestrearon durante los d -14 \pm 3, 5, 6, 7, 21, 31, 41 y 50 con respecto al parto. En todas esas evaluaciones se midió la CC con una escala de 5 puntos (Edmonson y col., 1989; Ferguson y col., 1994) y se obtuvo una muestra de sangre por punción coccígea con agujas 16G x 1 ½ y jeringas de 10 ml. Las muestras se colectaron en tubos de 10 ml que contenían EDTA-Na₂ al 10% y se mantuvieron en baño helado durante el muestreo. Dentro de las 4 h de obtenidas, se separaron los plasmas por centrifugación y se almacenaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml (2/muestra) a -20°C hasta el momento de su análisis. Se evaluó sistemáticamente la salud uterina mediante inspección directa del MV durante los dpp 5, 6, 7, 21, 31 y 41. El muestreo del MV se realizó manualmente con el procedimiento descrito por Sheldon y col. (2002a). El MV se categorizó de la siguiente manera: MV0=moco normal, claro y translúcido; MV1=moco con flóculos de pus; MV2=moco purulento sin olor fétido; y MV3=moco marrón-rojizo acuoso o purulento con olor fétido (Williams y col., 2005). Además, durante los dpp 5-7 se registró la TR con termómetro clínico de vidrio y se usó una TR \geq 39,1°C como indicativo de fiebre (Smith y col., 1998).

2.3. Criterios de diagnóstico

Se consideraron casos de MP en aquellas vacas que en los 5-7 dpp presentaron MV3 y fiebre ($TR \geq 39,1^{\circ}\text{C}$) y de MC en aquellas vacas que con MV3 no tuvieron fiebre ($TR \leq 39,0^{\circ}\text{C}$). Se diagnosticó EC en las vacas que mostraron MV1, 2 y 3 a partir de los 21 dpp en adelante (Sheldon y col., 2006).

2.4. Ensayo de Ceftiofur

Las vacas diagnosticadas con MP y MC en los 5-7 dpp (n=119) se asignaron, con un diseño completamente aleatorizado, al grupo tratado (n=60) donde recibieron 2,2 mg CEF sódico (Ceobiotic[®], Tecnofarm SRL) / kg PV durante 3 d consecutivos o al grupo control (n=59) donde actuaron como control negativo (sin tratamiento). La curación se estimó mediante la evaluación directa del MV 21 dpp como se describió anteriormente. Además, se hicieron re-evaluaciones a los 31 y 41 dpp. Se utilizaron dos definiciones de curación: total cuando se observaba el MV0; y parcial, cuando se encontraba el MV1 o el MV2.

2.5. Análisis de laboratorio

Se seleccionaron al azar las muestras de plasma sanguíneo de 110 y 50 vacas para determinar su concentración de metabolitos y hormonas metabólicas, respectivamente.

2.5.1. Metabolitos

Se determinaron los siguientes metabolitos con reactivos comerciales: los AGNE con el kit NEFA-HR (2)[®] (Wako Chemicals, Richmond, VA 23237, USA), el BHB kit Ranbut RB 1007[®] (Randox Laboratories Ltd, UK) y el NUP con el kit Urea

Color-2[®] (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron de 5,7, 6,3 y 6,5%, respectivamente. Los coeficientes de variación inter-ensayo fueron de 7,1, 7,6 y 7,8%, respectivamente. La concentración de metabolitos se expresa en μM para AGNE y BHB, y en mg/dL para el NUP.

2.5.2. Hormonas

Se determinaron las siguientes hormonas (IGF-1, insulina y leptina) mediante RIA validados previamente descriptos (Becu-Villalobos y col., 2007; Díaz-Torga y col., 2001; Lacau-Mengido y col., 2000). Brevemente, el RIA de IGF-1 se realizó, previa extracción en etanol-ácido y crio-precipitación, con anticuerpo para IGF-1 (UB2-495, Hormone Distribution Program of the NIDDK). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 7,2, y 8,8%, respectivamente. El RIA de insulina se realizó con anticuerpo anti-insulina bovina (Laboratorios Beta, Buenos Aires, Argentina). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 6,8, y 8,9%, respectivamente. Por último, el RIA de leptina se realizó con el método del doble anticuerpo, con antisuero específico ovino (Delavaud y col. 2002) y leptina recombinante bovina (DS Labs, Webster, Texas, USA, Becú-Villalobos y col. 2007). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 6,7, y 9,0%, respectivamente. La concentración de las hormonas metabólicas se expresa en ng/mL.

2.6. Análisis estadístico

Los datos se muestran como MMC \pm ES. La significación estadística se fijó en $P < 0,05$ y la tendencia en $P < 0,10$. Se utilizó una combinación de dos diseños, el de

mediciones repetidas y el completamente aleatorio, donde la vaca se consideró como la unidad experimental.

2.6.1. Variables binomiales

Los riesgos de MET, de curación y las variables de eficiencia reproductivas se analizaron con el procedimiento GENMOD de SAS 9.1 (SAS, 2003) con una distribución binomial y un enlace logit. Los modelos logísticos incluyeron los efectos fijos del número de partos (primíparas vs. multíparas), del tipo de parto (normal vs. anormal [parto anormal incluyó distocia, retención de placenta y mortinato]), de la MET (sin MET vs. MP vs. MC), del CEF (sí vs. no) donde es apropiado y de las interacciones de segundo orden. El modelo que evaluó el riesgo clínico de MET incluyó sólo los efectos fijos del número de partos y del tipo de parto, mientras que el usado para el riesgo metabólico involucró los efectos de la CC, los metabolitos (AGNE, BHB y NUP) y las hormonas metabólicas (IGF-1, insulina y leptina) 14±3 d preparto y 6 dpp. Por último, los modelos logísticos que estudiaron el efecto de la MET sobre la eficiencia reproductiva también fueron controlados por el efecto de la EC. Todas las modelizaciones se realizaron mediante el método de eliminación manual de variables con un criterio de exclusión fijado en $P > 0,2$.

2.6.2. Análisis de curvas COR

Los análisis de las curvas COR se realizaron con el Sigmaplot 10.0 (Systat, 2006). La curva COR analiza sensibilidad vs. 1-especificidad. La sensibilidad es la proporción de vacas con MET que tuvieron valores superiores al nivel de corte, mientras que la especificidad es la proporción de vacas sin MET que tuvieron valores

inferiores al nivel de corte (Greiner y col., 2000). Como valor de corte se utilizó el punto de la curva COR en el que se alcanzó la mayor sensibilidad y especificidad conjuntas. La interpretación del valor de corte se basó en el ABC. Con un ABC de 0,5 el test se consideró no informativo; con una de 0,5 a 0,7 como preciso; con un ABC de 0,7 a 0,9 como muy preciso; con una de 0,9 a 1,0 como altamente preciso; y finalmente, con un ABC de 1,0 como perfecto (Swets, 1988). La RP^+ es la probabilidad de que un valor superior al punto de corte provenga de un animal que posteriormente presentó MET.

2.6.3. Variables multinomiales

Las mediciones repetidas del MV durante el postparto (21, 31 y 41 dpp) se analizaron como una variable ordinal con el procedimiento GENMOD de SAS 9.1 (SAS, 2003) con una distribución multinomial (i.e.: MV0, MV1, MV2, MV3) y con un enlace logit acumulativo. El modelo incluyó los efectos fijos del tiempo (21 vs. 31 vs. 41 dpp), del número de partos (primíparas vs. multíparas), del tipo de parto (normal vs. anormal), de la MET (MP vs. MC), del CEF (si vs. no) y de las interacciones de segundo orden.

2.6.4. Variables tiempo al evento

Los intervalos entre el parto y la concepción y entre el parto y el rechazo hasta los 150 dpp se analizaron con el procedimiento PHREG de SAS 0.1 (SAS, 2003). Los modelos de riesgos proporcionales de Cox incluyeron los efectos fijos previamente descriptos para los modelos logísticos. La modelización se efectuó con el método de eliminación de variables ya descripto para esos modelos. Los valores de los intervalos de tiempo a la concepción y al refugio (mediana \pm IC 95%) se obtuvieron mediante el

análisis de supervivencia de Kaplan – Meier con el procedimiento LIFETEST de SAS 9.1 (SAS, 2003).

2.6.5. Variables continuas

La producción de leche, la CC, los metabolitos y las hormonas metabólicas se analizaron con el procedimiento MIXED de SAS 9.1 (SAS, 2003) como medidas repetidas. El modelo incluyó los efectos aleatorios de la vaca y los efectos fijos previamente descriptos. Se utilizó la estructura de covarianza que produjo el menor criterio de información de Akaike (Littell y col., 2002). Se empleó un contraste polinomial para evaluar los efectos lineales y cuadráticos del tiempo sobre las variables de respuesta, y además, se usó otro contraste para comparar los valores preparto con los postparto. Por último, en el modelo usado para evaluar la producción lechera acumulada a los 90 dpp se removió el efecto fijo del tiempo.

3. RESULTADOS

3.1. Prevalencia

La prevalencia de MC fue del 9,6% (29/303) y la de MP del 29,7% (90/303). Por tanto, la prevalencia total de MET fue del 39,3% (119/303).

3.2. Factores de riesgo

Las vacas multíparas tuvieron menores chances de padecer MET que las primíparas (RP=0,646, IC 95%=0,371-1,125, Tabla 3.1), mientras que las que experimentaron partos anormales tuvieron mayores chances de sufrir MET que sus compañeras de partos normales (RP=2,576, IC 95%=1,189-5,559, Tabla 3.1). Además, el riesgo de padecer MET aumentó a medida que se incrementan las

concentraciones de AGNE preparto (RP=1,001, IC 95%=0,999-1,002, Tabla 3.1) y de BHB postparto (RP=1,001, IC 95%=1,000-1,002, Tabla 3.1). Por el contrario, el riesgo de MET disminuyó a medida que aumentan los niveles de IGF-1 preparto (RP=0,652, IC 95%=0,349-1,219, Tabla 3.1) y de CC postparto (RP=0,080, IC 95%=0,019-0,328, Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Modelo logístico de los factores de riesgo para metritis en vacas Holando Argentino (n=303).

Factores de riesgo⁽²⁾	de	%	Incidencia n	RP⁽³⁾	Metritis⁽¹⁾ IC 95%⁽⁴⁾	P
Parición:						0,085
Primípara		48,9	44/90	Referente	Referente	
Múltipara		35,2	75/213	0,646	0,371-1,125	
Parto:						0,008
Normal		34,6	90/260	Referente	Referente	
Anormal		65,1	28/43	2,576	1,189-5,559	
CC postparto⁽⁵⁾		-	303	0,080	0,019-0,328	<0,001
AGNE preparto⁽⁶⁾		-	110	1,001	0,999-1,002	0,177
BHB postparto⁽⁷⁾		-	110	1,001	1,000-1,002	0,042
IGF-1 preparto⁽⁸⁾		-	50	0,652	0,349-1,219	0,144

⁽¹⁾Metritis: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido 5-7 dpp;

⁽²⁾Factores de riesgo (i.e.: indicadores metabólicos) con $P>0.2$ fueron excluidos de la tabla;

⁽³⁾RP: razón de probabilidad (del inglés: odds ratio);

⁽⁴⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽⁵⁾CC: condición corporal (escala de 5 puntos) 6 dpp;

⁽⁶⁾AGNE: ácidos grasos no esterificados (μM) 14 \pm 3 días preparto;

⁽⁷⁾BHB: ácido β -hidroxi-butírico (μM) 6 dpp;

⁽⁸⁾IGF-1: factor 1 de crecimiento similar a la insulina (ng/ml) 14 \pm 3 días preparto.

La interacción parición por parto no tuvo ningún efecto ($P>0.10$).

3.3. Diagnóstico

Las curvas COR mostraron que tanto la TR como la CC son precisas en el diagnóstico de MET puesto que tuvieron ABC de 0,604 \pm 0,036 ($P=0,003$) y de 0,636 \pm 0,029 ($P<0,001$), respectivamente. Para la TR el valor de corte detectado fue de 39,15°C con una sensibilidad de 0,566 y una especificidad de 0,638 (Figura 3.1). Mientras que para la CC el valor de corte fue de 2,63 con una sensibilidad de 0,504 y una especificidad de 0,706 (Figura 3.2).

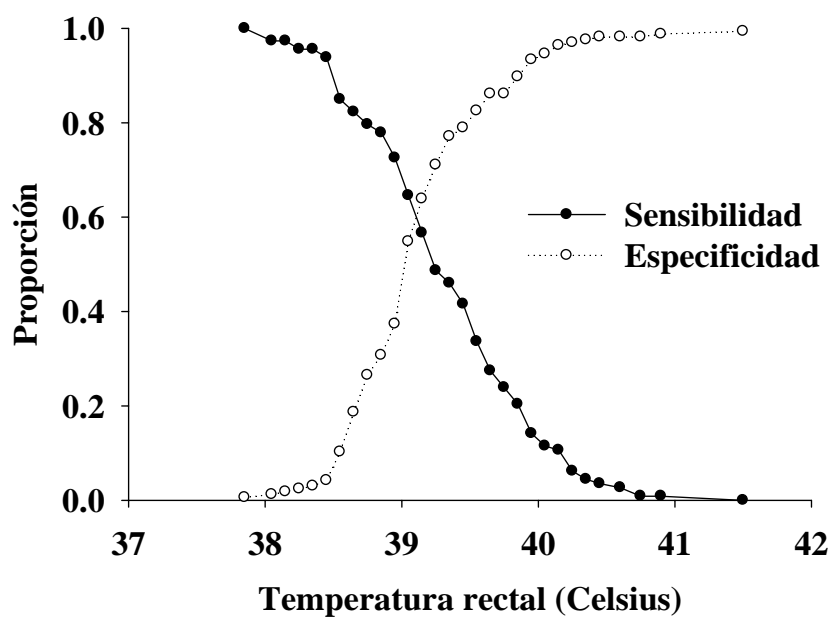


Figura 3.1. Análisis de la eficacia de la temperatura rectal 6 días postparto para el diagnóstico de metritis en vacas Holando Argentino (n=303).

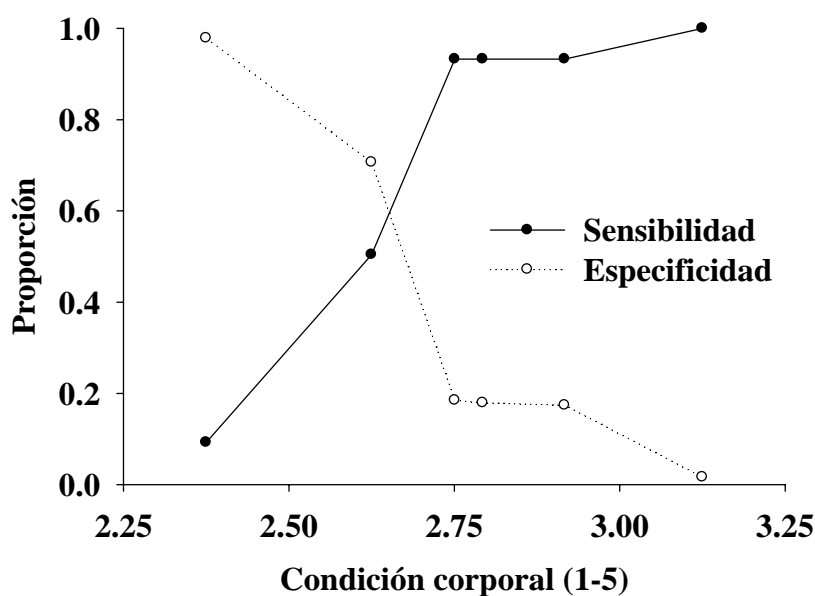


Figura 3.2. Análisis de la eficacia de la condición corporal 6 días postparto para el diagnóstico de metritis en vacas Holando Argentino (n=303).

3.4. Efectos reproductivos

3.4.1. Porcentaje de IATF y tasa de preñez a la IATF

En el modelo logístico la única variable explicativa que predijo la chance que tenían las vacas de recibir una IATF y de lograr la preñez en esa IATF (TP-IATF) fue el CEF, debido a que las vacas tratadas con CEF tuvieron mayores chances de recibir la IATF (RP=2,342, IC 95%=1,086-5,051, $P=0,057$) y de quedar preñadas en esa IATF (RP=2,117, IC 95%=0,589-7,608, $P=0,142$) que las vacas del grupo control sin tratar.

3.4.2. Tasa de preñez a los 100 dpp y de no preñez a los 200 dpp

En el modelo logístico la única variable explicativa que predijo la chance que tenían las vacas de quedar preñadas antes de los 100 dpp fue la MET ($P<0,001$),

puesto que las vacas con MP tuvieron menores chances de preñez que las que no presentaron MET (RP=0,219, IC 95%=0,095-0,502). Mientras que las que padecieron MC tuvieron una chance similar de preñez que las vacas sanas (RP=0,984, IC 95%=0,376-2,577, Tabla 3.2). Por otra parte, la MET ($P=0,095$) también fue la única variable explicativa que predijo la chance que tenían las vacas de no estar preñadas antes de los 200 dpp, debido a que las que padecían MP tuvieron mayores chances de no preñarse que las que no presentaron MET (RP=2,096, IC 95%=0,968-4,537), mientras que las que padecieron MC tuvieron una chance de no preñez similar a la de sus compañeras sanas (RP=0,599, IC 95%=0,129-2,779, Tabla 3.3).

Tabla 3.2. Modelo logístico del efecto de la metritis sobre la tasa de preñez a los 100 días postparto en vacas Holando Argentino (n=303).

		Tasa de preñez 100 días postparto			P
	%	N	RP ⁽¹⁾	IC 95% ⁽²⁾	
Parición:					0,190
Primípara	20,0	18/90	Referente	Referente	
Múltipara	33,8	72/213	1,640	0,556-4,840	
Parto:					0,195
Normal	31,9	83/260	Referente	Referente	
Anormal	16,3	7/43	0,557	0,230-1,352	
Metritis:					0,003
Sin metritis	37,5	69/184	Referente	Referente	
Clínica⁽³⁾	31,0	9/29	0,849	0,288-2,504	0,586
Puerperal⁽⁴⁾	13,3	12/90	0,189	0,070-0,479	0,001

⁽¹⁾RP: razón de probabilidad;

⁽²⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽³⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV3) sin fiebre en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁴⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre 5-7 dpp;

Las interacciones no tuvieron efecto ($P>0.10$).

Tabla 3.3. Modelo logístico del efecto de la metritis sobre la tasa de no preñez a los 200 días postparto en vacas Holando Argentino (n=303).

	%	N	Tasa de no preñez 200 días postparto		P
			RP ⁽¹⁾	IC 95% ⁽²⁾	
Parición:					0,810
Primípara	23,3	21/90	Referente	Referente	
Múltipara	16,4	35/213	0,902	0,237-3,436	
Parto:					0,626
Normal	17,7	46/260	Referente	Referente	
Anormal	23,3	10/43	1,004	0,388-2,596	
Metritis:					0,144
Sin metritis	16,3	30/184	Referente	Referente	
Clínica⁽³⁾	10,3	3/29	0,569	0,120-2,700	0,477
Puerperal⁽⁴⁾	25,6	23/90	1,929	0,907-4,101	0,088

⁽¹⁾RP: razón de probabilidad;

⁽²⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽³⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV3) sin fiebre en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁴⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre 5-7 dpp;

Las interacciones no tuvieron efecto ($P>0.10$).

3.4.3. Intervalo parto-concepción

En el modelo de riesgos proporcionales de Cox la única variable explicativa capaz de predecir la rapidez con que se alcanza la preñez fue la MET ($P=0,005$), dado que las vacas que sufrieron de MP mostraron un menor riesgo instantáneo de concebir que sus compañeras normales e incluso también que las afectadas con MC (TRI=0,753, IC 95%=0,621-0,911, $P=0,014$). A su vez, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier detectó que el IPC (Mediana, IC 95%) fue mayor para las vacas con MP (141, 120-150) que para las que tuvieron MC (120, 71-145) o que para las normales (105, 94-121, Log-Rank test=8,33, grados de libertad=2, $P=0,015$, Figura 3.3).

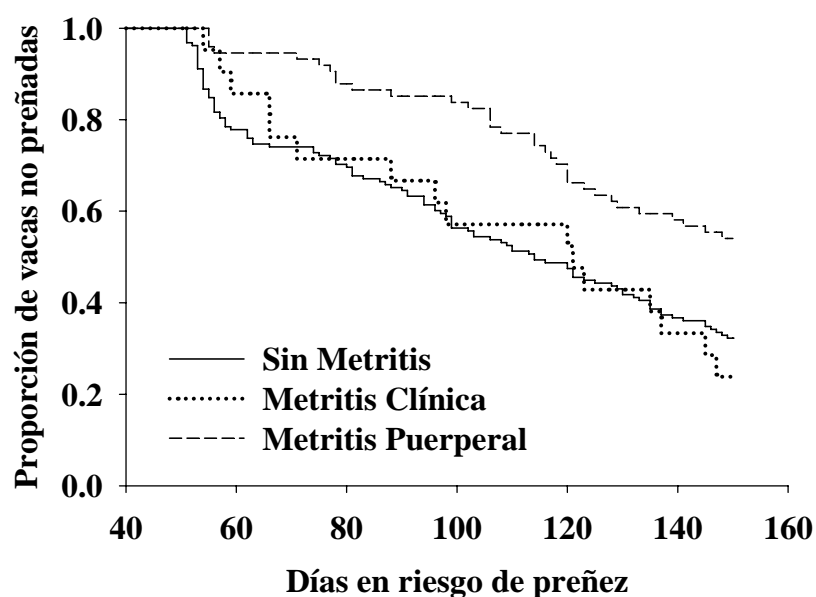


Figura 3.3. Análisis de supervivencia para el efecto de la metritis sobre el intervalo parto-concepción hasta los 150 días postparto en vacas Holando Argentino (n=303).

3.4.4. Rechazo reproductivo

En el grupo control sin tratar se refugó el 13,6% (6/44) de las vacas, mientras que en el grupo tratado con CEF se rechazó sólo el 1,8% (1/56) de los animales. El modelo logístico detectó que la única variable explicativa capaz de predecir el riesgo de rechazo reproductivo fue el CEF, debido a que los animales tratados mostraron chances de rechazo mucho menores que la de las vacas control (RP=0,121, IC 95%=0,015-1,066, $P=0,057$).

3.5. Curación

3.5.1. Modelo binomial de curación

Las tasas de curación total 21 dpp, para los grupos tratado y control, fueron de 14% (8/56) y de 16% (7/44, Tabla 3.4). El modelo logístico no detectó ningún efecto significativo de las variables explicativas sobre la curación total a los 21 dpp. Las tasas de curación parcial 21 dpp, para los grupos tratado y control, fueron de 54% (30/56) y de 55% (24/44, Tabla 3.5). El modelo logístico determinó que hubo un efecto significativo de la interacciones entre el número de partos y la MET ($P=0,035$) y entre el tipo de parto y el CEF ($P=0,004$) sobre la cura parcial 21 dpp. En el caso de la primera interacción, las vacas primíparas que padecieron MC tuvieron mejor curación parcial que las que tenían MP ($P=0,098$), mientras que en el grupo de las multíparas fue al revés, dado que se sanaron más las que tenían MP ($P=0,223$). En la segunda interacción, las vacas con partos normales del grupo control mejoraron más que las tratadas ($P=0,061$), en tanto que en las vacas con partos anormales se recuperaban más las que recibían el CEF ($P=0,041$).

Las tasas de curación total 41 dpp para las tratadas y control fueron de 55% (31/56) y 45% (20/44), mientras que las de curación parcial 41 dpp para las tratadas y control fueron de 38% (21/56) y 45% (20/44). Los modelos logísticos no detectaron efectos significativos de ninguna de las variables explicativas sobre ninguna de las dos tasas de curación a los 41 dpp.

Tabla 3.4. Modelo logístico del efecto del Ceftiofur sobre la curación total de metritis en vacas Holando Argentino (n=100).

	%	N	Curación total ⁽¹⁾		<i>P</i>
			RP ⁽²⁾	IC 95% ⁽³⁾	
Parición:					0,368
Primípara	15,9	7/44	Referente	Referente	
Múltipara	14,3	8/56	0,566	0,164-1,950	
Parto:					0,809
Normal	15,6	12/77	Referente	Referente	
Anormal	13,0	3/23	0,839	0,202-3,482	
Metritis:					0,560
Clínica⁽⁴⁾	16,0	4/25	Referente	Referente	
Puerperal⁽⁵⁾	14,7	11/75	0,661	0,164-2,663	
Ceftiofur:					0,468
No	15,9	7/44	Referente	Referente	
Si	14,3	8/56	0,654	0,208-2,061	

⁽¹⁾Curación total: presencia de moco vaginal normal (MV0) 21 días postparto (dpp).

⁽²⁾RP: razón de probabilidad;

⁽³⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽⁴⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV3) sin fiebre en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁵⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre 5-7 dpp;

Las interacciones no tuvieron efecto ($P>0.10$).

Tabla 3.5. Modelo logístico del efecto del Ceftiofur sobre la curación parcial de metritis en vacas Holando Argentino (n=100).

		Curación parcial ⁽¹⁾			P
		%	N	RP ⁽²⁾	
Parición:					0,405
	Primípara	38,6	17/44	Referente	Referente
	Múltipara	62,5	35/56	1,589	0,616-4,099
Parto:					0,384
	Normal	49,4	38/77	Referente	Referente
	Anormal	60,9	14/23	1,658	0,545-5,051
Metritis:					0,821
	Clínica⁽⁴⁾	52,0	13/25	Referente	Referente
	Puerperal⁽⁵⁾	52,0	39/75	1,333	0,454-3,882
Ceftiofur:					0,450
	No	54,5	24/44	Referente	Referente
	Si	53,6	30/56	0,395	0,136-1,145

⁽¹⁾Curación parcial: presencia de moco vaginal con flóculos de pus o mucopurulento sin olor fétido (MV1 and 2) 21 dpp.

⁽²⁾RP: razón de probabilidad;

⁽³⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽⁴⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV3) sin fiebre en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁵⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre 5-7 dpp;

Las interacciones de parición por metritis y de parto por Ceftiofur tuvieron efecto sobre la curación parcial ($P=0,035$ y $0,004$, respectivamente). En el primer caso, se curaron más las primíparas con metritis clínica que no metritis puerperal (100% vs. 61,8%, $P=0,098$), mientras que en las múltiparas se curaron más las que tenían metritis puerperal (78,4 vs. 63,6%, $P=0,223$). En el segundo caso, la curación fue mayor en las vacas de parto normal que no recibieron tratamiento que en las que fueron tratadas con Ceftiofur (78,8 vs. 58,5%, $P=0,061$), mientras que dentro de las vacas con partos anormales la curación fue más elevada en las tratadas que en las controles (92,3 vs. 55,6%, $P=0,041$).

El resto de las interacciones no afectó la curación parcial ($P>0.10$).

3.5.2. Modelo multinomial de curación

La evolución de la curación total y parcial de MET durante el período postparto se muestra en la Figura 3.4, en la que se observa como incrementa el porcentaje de animales que se curan completamente a medida que transcurre el tiempo durante el postparto. El modelo de regresión multinomial detectó que a medida que avanzan los dpp aumenta la probabilidad de cura total (RP=1,114, IC 95%=1,084-1,145, $P<0,001$). Debido a que el RP para la variable día está sobrestimado (i.e.: 11% de incremento en la tasa de curación por dpp) se utilizó una corrección propuesta por Allison (1999) con la siguiente fórmula: $\beta * p_i(1-p_i)$, donde β es el coeficiente de la regresión para día [0,1079 (IC 95%=0,0808-0,1351)] y p_i es la probabilidad de cura total (0,7604). Finalmente, el cambio corregido en la probabilidad de curación total fue de 0,020 (0,015-0,025) por cada día que pasa durante el postparto (7-41 dpp). Este modelo multinomial también reveló que el tipo de MET afecta la curación, debido a que las vacas con MC tuvieron el doble de chances de curarse totalmente que las que padecían MP (RP=1,956, IC 95%=1,151-3,324, $P=0,013$). Por otra parte, el tratamiento con CEF y el resto de las variables explicativas e interacciones no tuvieron ningún efecto sobre la curación ($P>0,1$).

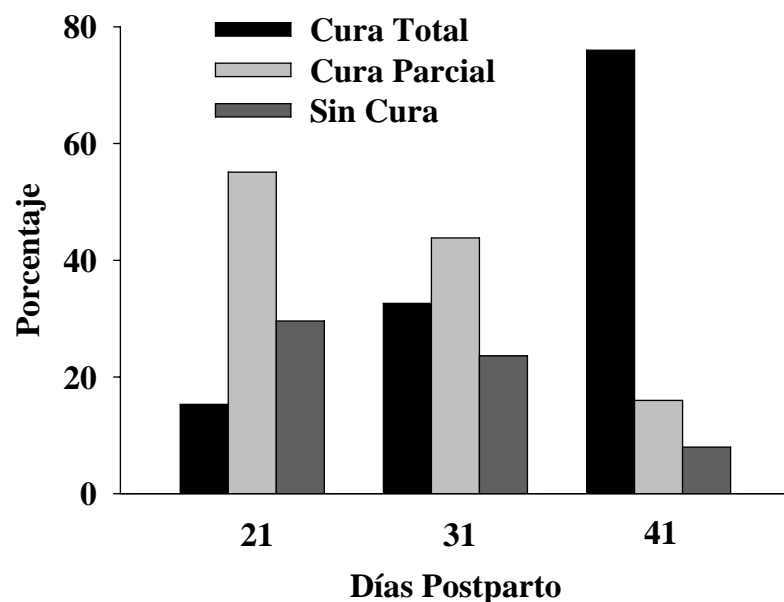


Figura 3.4. Curación de metritis en vacas Holando Argentino (n=100) durante el postparto.

3.5.3. Efecto del balance energético sobre la curación

Los modelos logísticos revelaron que la chance de curación total se incrementa a medida que aumentan las concentraciones de insulina tanto en el preparto (RP=6,412, IC 95%=0,765-53,750, $P=0,143$) como en el postparto (RP=8,272, IC 95%=1,074-63,710, $P=0,011$). Además, detectaron que la chance de cura total también se acrecienta a medida que se elevan las CC en el postparto (RP=41,441, IC 95%=0,292-999,999, $P=0,129$). Por último, el resto de los indicadores de BE no afectaron la curación ($P>0,10$).

3.6. Efecto de la metritis sobre la producción de leche

El modelo mixto de mediciones repetidas determinó que el tiempo postparto tuvo un efecto sobre la producción de leche ($P<0,001$, Tabla 3.6) que según el contraste polinomial fue de tipo cuadrático ($P<0,001$, Tabla 3.6), que las vacas multíparas produjeron más leche que las primíparas ($26,76\pm0,71$ vs. $25,60\pm0,87$ kg/d, $P=0,025$, Tabla 3.6), y que la MET no tuvo efecto sobre la producción de leche ($25,72\pm0,49$ vs. $26,36\pm0,58$ kg/d, para las vacas sin y con MET, respectivamente, $P=0,380$, Tabla 3.6). Este modelo reveló que hubo una interacción significativa entre el tiempo y la MET ($P<0,001$, Tabla 3.6), debido a que las vacas con MET produjeron menos leche (~ 4 kg/d, $P<0,01$) que sus compañeras al inicio de la lactancia, mientras que este efecto se revirtió la final de la lactación donde produjeron más (~ 1 kg/d, Figura 3.5). La interacción entre el tiempo y el número de partos también fue significativa ($P<0,001$) dado que las multíparas en comparación con las primíparas dieron más leche al principio (~ 5 kg/d, $P<0,01$) y menos al final de la lactancia (~ 3 kg/d, $P<0,01$, Figura no mostrada). El resto de las interacciones no tuvo ningún efecto sobre la producción de leche ($P>0,10$).

El modelo mixto para producción de leche acumulada a los 90 d evidenció que las vacas multíparas produjeron más que las primíparas ($2640,97\pm77,36$ vs. $2191,94\pm88,19$, $P<0,001$), y también que las vacas normales (sin MET) fueron más productivas que las que sufrieron tanto MC como MP ($2646,56\pm82,10$ vs. $2235,62\pm172,11$ vs. $2367,20\pm77,45$, respectivamente, $P=0,009$). Por último, el tratamiento con CEF no tuvo ningún efecto sobre la producción a los 90 d ($P=0,148$).

3.7. Efecto de la metritis sobre el balance energético

Los modelos mixtos de mediciones repetidas detectaron que las vacas que padecieron MET tuvieron menores CC que las vacas normales ($2,58 \pm 0,02$ vs. $2,67 \pm 0,02$, $P=0,004$, Tabla 3.6), y que hubo efectos de la interacción entre el tiempo (d) y la MET sobre las concentraciones de AGNE, BHB, NUP y de IGF-1 ($P=0,022$, $0,009$, $0,010$ y $0,007$, respectivamente, Tabla 3.6 y Figura 3.6). Finalmente, estos modelos no hallaron ningún efecto de la MET sobre los valores de insulina ($P=0,851$) ni de leptina ($P=0,352$, Tabla 3.6).

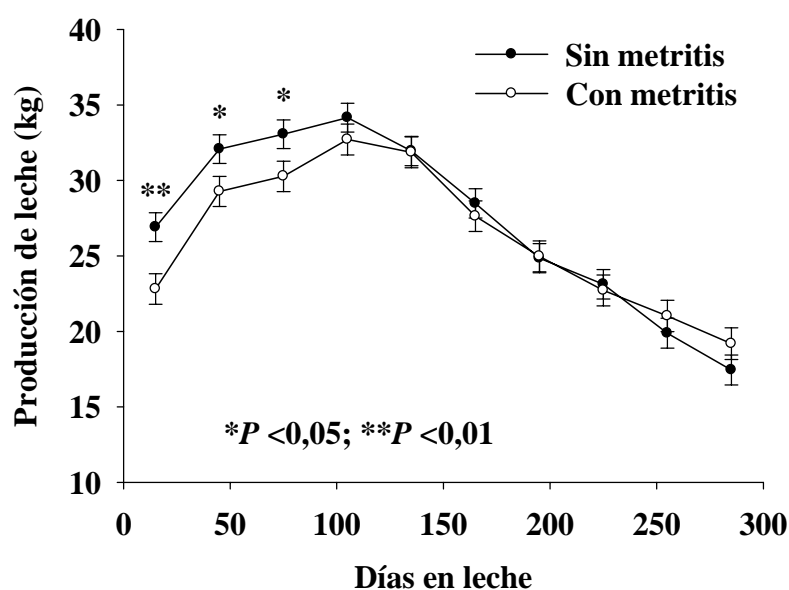


Figura 3.5. Efecto de la metritis sobre la producción de leche en vacas Holando Argentino (n=303).

El modelo lineal de mediciones repetidas detectó una interacción entre el tiempo y la MET ($P<0,001$) sobre la cantidad de leche producida.

Tabla 3.6. Efectos de la metritis sobre la producción de leche y algunos indicadores del estatus metabólico en vacas Holando Argentino.

	MET ⁽¹⁾			Tiempo ⁽²⁾	MET ⁽¹⁾	Tiempo*MET	Lineal <i>P</i>	Cuad ⁽³⁾	Pre-Pos ⁽⁴⁾
	No (MMC)	Si (MMC)	(ES)						
Leche⁽⁵⁾	25,72	26,36	0,49	<0,001	0,380	<0,001	<0,001	<0,001	-
CC⁽⁶⁾	2,67	2,58	0,02	<0,001	0,004	0,994	<0,001	<0,001	<0,001
AGNE⁽⁷⁾	676,14	563,21	30,52	0,058	0,022	0,022	0,266	0,022	0,003
BHB⁽⁸⁾	525,54	482,44	30,44	0,047	0,354	0,009	0,825	0,002	0,106
NUP⁽⁹⁾	10,60	9,54	0,55	<0,001	0,168	0,010	<0,001	0,051	<0,001
IGF-1⁽¹⁰⁾	233,09	224,75	21,34	<0,001	0,796	0,070	<0,001	<0,001	<0,001
Insulina	1,47	1,43	0,12	0,181	0,851	0,671	0,781	0,297	0,974
Leptina	1,22	1,83	0,45	0,565	0,352	0,513	0,739	0,465	0,367

⁽¹⁾MET: la metritis se diagnosticó cuando las vacas presentaban moco vaginal acuoso y fétido 5-7 días postparto;

⁽²⁾Tiempo: días en relación al parto (d: -14, 6, 21, 31, 41 y 50);

⁽³⁾Cuad: contraste para efectos cuadráticos del tiempo;

⁽⁴⁾Pre-Pos: contraste para los valores preparto vs. postparto;

⁽⁵⁾Leche: producción de leche (kg/d), n=303;

⁽⁶⁾CC: condición corporal (escala de 5 puntos), n=303;

⁽⁷⁾AGNE: ácidos grasos no esterificados (μM), n=110;

⁽⁸⁾BHB: ácido β-hidroxi-butírico (μM), n=110;

⁽⁹⁾NUP: nitrógeno ureico en plasma (mg/dl), n=110;

⁽¹⁰⁾IGF-1: factor 1 de crecimiento similar a la insulina (ng/ml), n=50.

La parición (primípara vs. múltipara) tuvo efecto sobre la producción de leche (26,76±0,71 vs. 25,60±0,87 kg/d, $P=0,025$), sobre la CC (2,59±0,03 vs. 2,65±0,02, $P=0,094$), sobre los AGNE (555,38±32,64 vs. 630,89±22,09, $P=0,058$), sobre el NUP (8,10±0,68 vs. 12,05±0,46, $P<0,001$) y sobre la insulina (1,62±0,12 vs. 1,28±0,15, $P=0,074$).

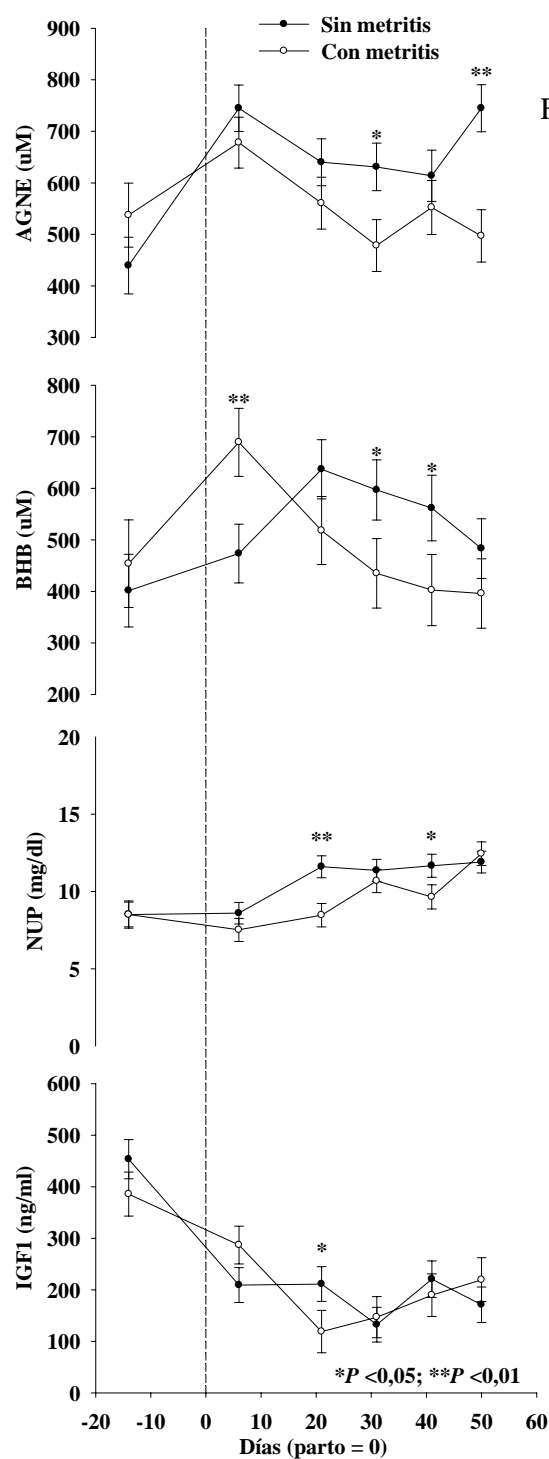


Figura 3.6. Efecto de la metritis sobre la concentración de ácidos grasos no esterificados (AGNE), β -hidroxi-butarato (BHB), nitrógeno ureico plasmático (NUP) y factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) en vacas Holando Argentino (n=110 para metabolitos y n=50 para IGF-1).

El modelo lineal de mediciones repetidas encontró una interacción significativa entre el tiempo y la MET sobre los AGNE, BHB, NUP y el IGF-1 ($P=0,022$, $0,009$, $0,010$ y $0,007$, respectivamente).

1 **4. DISCUSIÓN**

2

3 Los objetivos del estudio fueron evaluar los factores de riesgo de MET, los
4 efectos de la MET sobre la producción de leche y la eficiencia reproductiva, y por
5 último, la eficacia del CEF sobre la tasa de curación y sobre la productividad de los
6 animales. La prevalencia de MET estuvo dentro del rango de valores previamente
7 reportados (Fourichon y col., 1999, 2000), pero fue bastante más alta que la
8 encontrada en animales en pastoreo sin suplementación (Mejía y Lacau-Mengido,
9 2005).

10 **4.1. Factores de riesgo**

11 Según nuestros hallazgos, el riesgo de MET es mayor en las vacas primíparas,
12 en las que tienen problemas al parto y en las que poseen un BEN más pronunciado
13 (i.e.: altos niveles de AGNE y bajos de IGF-1 en el parto junto con altos valores
14 de BHB y baja CC en el postparto). El efecto de los partos anormales (i.e.: distocia y
15 retención de placenta) sobre la MET que encontramos en nuestro estudio coincide
16 plenamente con otros trabajos previos (Dubuc y col., 2011a; Correa y col., 1993;
17 Gröhn y col., 1990; Kaneene y Miller, 1995) y la explicación de esta asociación sería
18 que los partos anormales requieren de asistencia humana, lo que lleva a incrementar
19 las posibilidades de lesión uterina y de contaminación bacteriana, y por tanto, de
20 desarrollar MET (Bolinder y col., 1988; Kaneene y col., 1986; Sheldon y col., 2004).
21 Del mismo modo, se ha descrito que los animales primíparos tienen más riesgo de
22 MET por su mayor probabilidad de necesitar asistencia al momento del parto (Bell y
23 Roberts, 2007; Bruun y col., 2002; Hossein-Zadeh y Ardalan, 2011). Por otra parte, la
24 relación que hemos encontrado entre los indicadores del BEN y la MET concuerda

1 plenamente con los resultados hallados en estudios muy recientes, dado que altas
2 concentraciones de AGNE y de BHB incrementan el riesgo, mientras que
3 contrariamente, altos valores de IGF-1 y de CC, lo reducen (Dubuc y col., 2011a;
4 Ospina y col., 2010). De hecho, estos autores han propuesto valores de corte de
5 AGNE preparto de 300 μM (Ospina y col., 2010) y de 600 μM (Dubuc y col., 2011a)
6 para predecir la MET. Estas altas concentraciones de AGNE y de BHB junto con los
7 bajos niveles de IGF-1 y de CC serían indicativos de un BEN marcado, y
8 posiblemente, reflejen un consumo de materia seca disminuido (Bell, 1995; Horst y
9 col., 1997), así como también se ha descrito que ese BEN tendría efectos deletéreos
10 sobre la función de los neutrófilos lo que perjudicaría la salud uterina (Bell, 1995;
11 Horst y col., 1997).

12 Aunque ha sido revisada recientemente en los animales domésticos la
13 interacción global entre el sistema nervioso, el endócrino y el inmune (Borghetti y
14 col., 2009), este sería el primer estudio que evalúa la relación específica entre el IGF-
15 1 y el riesgo de MET. El IGF-1 podría estimular la respuesta inmune no sólo por su
16 acción directa (Heng y col., 2010) sino también de modo indirecto mediante sus
17 efectos anabólicos (Hadley y Hinds, 2002). A su vez, las citoquinas pro-inflamatorias
18 regularían la actividad del IGF-1 (O'Connor y col., 2008). Por tanto, podría
19 especularse que el IGF-1 desempeña un rol importante en el desarrollo de la MET.

20 **4.2. Diagnóstico**

21 Tanto la TR como la CC son herramientas diagnósticas precisas dado que
22 presentan ABC de aproximadamente 0,6 (Swets, 1988). Nuestro valor de corte para

1 TR de 39,15°C es levemente inferior al recientemente propuesto de 39,5°C en la
2 definición del caso clínico de MET (Sheldon y col., 2006). Con relación a la CC, el
3 valor de corte sería de 2,62 y hasta donde sabemos este es el primer trabajo en el que
4 se genera esa información.

5 **4.3. Efectos reproductivos**

6 La MET, especialmente la MP, tiene efectos negativos sobre la eficiencia
7 reproductiva puesto que reduce la P100 e incrementa el IPC. Estos hallazgos
8 concuerdan con trabajos previos que sugieren esa relación negativa entre la MET y la
9 reproducción (Fourichon y col., 2000). Esos efectos nocivos podrían explicarse de
10 varias maneras: primero, por medio del retraso en el retorno a la ciclicidad postparto
11 que experimentan las vacas afectadas con MET (Mateus y col., 2002; Sheldon y col.,
12 2002b); segundo, mediante la disrupción del ambiente intrauterino que provoca esta
13 enfermedad en las vacas (BonDurant, 1999; Sheldon y Dobson, 2004); y tercero,
14 porque la MET también perjudica el desarrollo del embrión en el útero (Soto y col.,
15 2003).

16 **4.5. Efecto sobre la producción de leche**

17 La MET y más precisamente la MP posee efectos negativos sobre la
18 producción al inicio de la lactación. Esto último coincide con lo encontrado
19 recientemente por otros autores quienes observaron que las vacas que presentan MET
20 producen menos leche hasta el momento de pico de lactancia y que luego, compensan
21 parcialmente ese menor rendimiento al producir un poco más en el final de la
22 lactación (Bell y Roberts, 2007; Dubuc y col., 2011a; Rajala y Grohn, 1998; Wittrock
23 y col., 2011). Una explicación posible para estos efectos sería que la MET se asocia

1 con un menor consumo de materia seca (Bell y Roberts, 2007; Wittrock y col., 2011),
2 que, de hecho, ha sido detectado incluso antes del parto (Huzzey y col., 2007, Urton y
3 col., 2005) lo que reduciría la energía disponible para la lactogénesis. Además, se
4 sabe que los tejidos afectados liberan grandes cantidades de agentes pro-inflamatorios
5 como las citoquinas, que podrían causar un desvío en el flujo de los compuestos
6 energéticos desde los tejidos productivos como la glándula mamaria hacia los
7 sistemas de defensa como son los leucocitos (Borghetti y col., 2009; Waldron, 2011).
8 Por tanto, las vacas con MET producirían menos leche en un intento por conservar
9 energía para poder afrontar las enormes demandas del sistema inmune que lucha
10 contra las infecciones uterinas.

11 **4.4. Efectos del CEF**

12 El CEF no tiene ningún efecto sobre la curación de la MET, sobre la
13 eficiencia reproductiva, ni sobre la producción de leche. El único efecto detectado es
14 el de reducir los rechazos por causas reproductivas. En este sentido, existen algunos
15 trabajos que evalúan la utilidad de la terapia con CEF (Chenault y col., 2001; Drillich
16 y col., 2001; Smith y col., 1998; Zhou y col., 2001), pero uno de los inconvenientes
17 que presentan es que han usado diseños diferentes, puesto que unos incluyen
18 controles positivos (Drillich y col., 2001; Smith y col., 1998) y otros controles
19 negativos (Chenault y col., 2001; Zhou y col., 2001). El otro problema es que la
20 mayoría fijó como criterio de curación una $TR < 39.5^{\circ}\text{C}$ (Drillich y col., 2001; Smith y
21 col., 1998; Zhou y col., 2001). Es decir, estos autores informaban que la terapia había
22 sido exitosa si remitía la fiebre, a pesar de que advertían que muchas vacas
23 continuaban teniendo MV fétido (Drillich y col., 2001). En otras palabras, la TR

1 sobreestimaría la respuesta al tratamiento (Chenault y col., 2001). El otro aspecto que
2 no se ha tenido en cuenta en estos trabajos es el de las variables de interés productivo:
3 la eficiencia reproductiva y la producción de leche. Sólo un estudio, que usó control
4 positivo, reporta que el CEF no tiene efectos sobre la tasa de preñez a primo-
5 inseminación ni en el IPC (Drillich y col., 2001). Por último, en nuestro trabajo, el
6 único efecto detectado del CEF es el de reducir los rechazos. La explicación de este
7 hallazgo podría deberse al hecho de que como el CEF es usado para tratar afecciones
8 respiratorias, mastitis y laminitis (Zwald y col., 2004), esto probablemente reduciría
9 el impacto negativo de estas otras enfermedades sobre la eficiencia reproductiva, lo
10 que redundaría en menores chances de refugo. Nuestra investigación sería la única
11 que informa los efectos del CEF sobre variables de interés productivo habiéndolos
12 contrastado con un control negativo.

13 **4.5. Efectos del BE en la curación**

14 Un hallazgo interesante de nuestro estudio es que los altos niveles de insulina
15 (y de CC) incrementan la tasa de curación. Hasta donde sabemos, éste es el primer
16 reporte de un efecto positivo de la insulina sobre la cura de MET. Se sabe que existe
17 un equilibrio entre las hormonas como la somatotrofina, los glucocorticoides y la
18 insulina y los agentes pro-inflamatorios como las citoquinas, que también involucra a
19 los sistemas nervioso, endócrino e inmune y a los tejidos como el muscular y el
20 adiposo (Borghetti y col., 2009). Además, este balance puede influenciar la respuesta
21 inmune y por tanto, la severidad de la enfermedad durante los procesos inflamatorios
22 (Borghetti y col., 2009). En ausencia de inflamación, el balance entre las hormonas y
23 los pro-inflamatorios es óptimo, puesto que los glucocorticoides inhiben la síntesis de

1 las citoquinas. Por el contrario, cuando hay procesos inflamatorios este balance se
2 rompe porque los tejidos dañados producen enormes cantidades de citoquinas que
3 inducen resistencia a los glucocorticoides, a la somatotrofina – IGF-1 y a la insulina.
4 De este modo, se establece un estado catabólico caracterizado por lipólisis, proteólisis
5 y gluconeogénesis (Kelley y col., 2007) y, a su vez, el organismo responde frente a la
6 refractariedad hormonal inducida por las citoquinas produciendo mayor cantidad de
7 estas hormonas. Así, intenta aumentar la razón entre las hormonas y las citoquinas
8 para poder superar, al menos parcialmente, esos efectos nocivos de los pro-
9 inflamatorios (Kelley y col., 2007). Ante el escenario descrito previamente parece
10 razonable pensar que las altas concentraciones de insulina se relacionen con mayores
11 chances de curación en nuestras vacas.

12 En resumen, el BEN podría estar involucrado no sólo en el desarrollo de la
13 MET sino también en el riesgo de curación de la enfermedad. Es decir, un BE más
14 negativo predispondría a las vacas a la MET y reduciría las chances de éxito de la
15 terapia antibiótica contra la enfermedad.

16 **4.6. Tiempo postparto y curación**

17 La probabilidad de que los animales afectados de MET se curen aumenta a
18 medida que transcurre el tiempo postparto (aproximadamente 2% por dpp) y es mayor
19 en las vacas que no poseen fiebre (i.e.: MC). A su vez, como la terapia con CEF no
20 afecta la curación, podría considerarse al efecto del tiempo como un indicador del
21 nivel de auto-curación de los animales. Por tanto, esta sería la primera medida
22 objetiva de la curación espontánea de MET en las vacas lecheras durante el postparto.
23 El hecho de que las vacas con MC tengan mayores probabilidades de curarse que las

1 que poseen MP es bastante razonable debido a las diferencias en el riesgo de muerte
2 que se presentan entre ambas. Es decir, la MP es una entidad mucho más severa que
3 se acompaña de signos sistémicos (i.e.: depresión y fiebre) y por tanto, presupone un
4 riesgo para la vida de los animales. Por el contrario, la MC se restringe sólo al útero y
5 no compromete la vida (Sheldon y col., 2006).

6 **4.7. Efectos metabólicos**

7 Las vacas con MET tienen menores CC que sus compañeras y existe una
8 interacción entre el tiempo y la MET sobre las concentraciones de AGNE y de BHB,
9 puesto que los animales con MET presentan niveles más altos alrededor del parto y
10 luego más bajos a medida que avanza la lactancia. Por tanto, esto estaría reflejando
11 que las vacas con MET poseen un BEN más marcado periparto a causa,
12 posiblemente, del menor consumo de alimento. Por otro lado, ese patrón se revierte
13 luego, durante la lactancia, como consecuencia de un incremento en la demanda de
14 energía para sostener la mayor producción láctea detectada en las vacas sanas.

15

16 **5. CONCLUSIONES**

17 En conclusión, un BE más negativo incrementa el riesgo de MET y reduce la
18 respuesta al tratamiento con CEF. La terapia con CEF disminuye los rechazos por
19 causas reproductivas. Además, la curación aumenta con el transcurso del tiempo
20 postparto (~2.0% por dpp) y cuando la MET no se acompaña con fiebre. Finalmente,
21 la MET (especialmente la MP) disminuye la producción al inicio de la lactancia y la
22 tasa de preñez con lo que alarga el IPC.

CAPÍTULO IV

ENDOMETRITIS CLÍNICA EN VACAS LECHERAS

1. INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en el capítulo anterior, la endometritis afecta a muchas vacas lecheras durante el postparto y provoca importantes pérdidas reproductivas (Barlund y col., 2008; Dubuc y col., 2010a, 2011b; Fourichon y col., 2000; Gautam y col., 2009, 2010a; Gilbert y col., 2005; LeBlanc y col., 2002; McDougall y col., 2007; Runciman y col., 2008). Si bien no existe una técnica diagnóstica que sirva como patrón de oro o estándar, la evaluación del MV ha sido la técnica de diagnóstico más utilizada, puesto que la presencia de pus se correlaciona con la carga de bacterias patógenas halladas en el útero (LeBlanc y col., 2002; Williams y col., 2007). Cabe mencionar que a pesar de que desde hace tiempo existe un acuerdo generalizado sobre los efectos negativos de la MET y la EC, no se contaba con una definición estandarizada y de aceptación universal de lo que se consideraba un caso de estas dos enfermedades (Barlund y col., 2008; Gilbert y col., 2005). Por tanto, esto último tornaba muy difíciles las comparaciones entre diferentes estudios, fundamentalmente, debido a las distintas definiciones empleadas por los autores. En este sentido, muy recientemente, se estandarizaron esas definiciones y, por ejemplo, se estableció que debe diagnosticarse la EC en aquellas vacas que poseen pus en su MV después de los 21 dpp y que no presentan signos sistémicos de enfermedad (Sheldon y col., 2006). Estos mismos autores fijaron que la endometritis subclínica se

determina cuando las vacas presentan una citología uterina con más del 18% de células polimorfonucleares entre 21-33 dpp o con más del 10% entre los 34-47 dpp (Sheldon y col., 2006). Por otra parte, entre los factores de riesgo clínico más reconocidos de la EC se encontrarían los problemas al parto tales como la distocia, la retención de placenta y los natimortos, y también la MET (Dubuc y col., 2010a; Gautam y col., 2010a; Ghanem y col., 2002; Le Blanc y col., 2002; Potter y col., 2010). Contrariamente, y en relación con los factores de riesgo metabólico, los resultados han sido más controvertidos, puesto que algunos investigadores han encontrado un efecto de los AGNE en el preparto sobre el riesgo de EC (Kaufmann y col., 2010; Konyves y col., 2009), mientras que otros no (Dubuc y col., 2010a). Por tanto, no se cuenta con información concluyente sobre el impacto del BEN en el desarrollo de la EC. Además, existen muy pocos datos acerca de la magnitud de la curación espontánea de EC durante el período postparto (Dubuc y col., 2011b; Gautam y col., 2010a) y una falta total de estudios que evalúen la relación entre la EC, los metabolitos y las hormonas metabólicas (Burke y col., 2010).

1.1. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- a. Evaluar los factores de riesgo clínico y metabólico de la EC en vacas lecheras.
- b. Determinar el valor de los indicadores de BE para predecir la enfermedad a nivel individual.
- c. Medir la tasa de curación espontánea de EC durante el postparto.

- d. Valorar los efectos de la EC sobre la eficiencia reproductiva, la producción de leche y los indicadores del BE.

1.2. Hipótesis

Las hipótesis más relevantes de este capítulo fueron:

- a. El riesgo de EC en vacas lecheras aumenta con los problemas al parto y con un BE más negativo.
- b. La EC perjudica la eficiencia reproductiva en las vacas lecheras.
- c. La EC no afecta la producción de leche ni el BE de las vacas lecheras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales y tratamientos

El estudio se realizó en un tambo comercial ubicado en Ordoñez, provincia de Córdoba, Argentina (32°49' Sur, 62°52' Oeste) en el que se evaluaron vacas Holando Argentino (n=303) de parición otoñal. Durante el preparto (tres semanas anteriores a la de la fecha probable de parto), los animales se mantuvieron en corrales en los que se los monitoreaba por signos de parto. Los primeros tres dpp, se alojaron en el corral de vacas recién paridas y el cuarto dpp se trasladaron al rodeo en lactancia si estaban saludables. Se las alimentaba cuatro veces por día con raciones totalmente mezcladas que estaban formuladas para cubrir los requerimientos establecidos por el NRC (2001) y se realizaron tres ordeñes / d (04:00, 12:00 y 20:00 h). Después de un período de espera voluntario de 40 d, las vacas que tenían el alta reproductiva postparto recibieron una IATF con el siguiente protocolo: el d 41±3 se les insertó un dispositivo intravaginal con 1g de P₄ (DIB[®], Syntex SA) y se les administraron 50 µg

de lecirilina (GnRH, Gonasyn[®], Syntex SA); el d 48±3 se les removió el dispositivo y se les administraron 150 µg de cloprostenol (PGF, Ciclase[®], Syntex SA); el d 50±3 se les suministraron 50 µg de GnRH, y el d 51±3 se les efectuó la IA (+16 h). El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación rectal aproximadamente 35 d después de la IATF. Posteriormente, las vacas que retornaban al celo fueron detectadas (2 veces / d) e inseminadas artificialmente con la regla AM/PM. La historia productiva y reproductiva de todas las vacas involucradas en el estudio se obtuvo de los registros del establecimiento.

2.2. Muestreo

Las vacas del experimento se muestrearon durante los d -14±3, 6, 21, 31, 41 y 50 con respecto al parto. En todas esas evaluaciones se midió la CC con una escala de 5 puntos (Edmonson y col., 1989; Ferguson y col., 1994) y se obtuvo una muestra de sangre por punción coccígea con agujas 16G x 1 ½ y jeringas de 10 ml. Las muestras se colectaron en tubos de 10 ml que contenían EDTA-Na₂ al 10% y se mantuvieron en baño helado durante el muestreo. Dentro de las 4 hs de obtenidas, se centrifugaron y los plasmas se almacenaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml (2/ muestra) a -20°C hasta el momento de su análisis. Se evaluó sistemáticamente la salud uterina mediante inspección directa del MV durante los dpp 5-7, 21, 31 y 41. El muestreo del MV se realizó manualmente con el procedimiento descrito por Sheldon y col. (2002a). El MV se categorizó de la siguiente manera: MV0=moco normal, claro y translúcido; MV1=moco con flóculos de pus; MV2=moco mucopurulento, sin olor fétido; y

MV3=moco marrón-rojizo acuoso o purulento con olor fétido (Williams y col., 2005).

2.3. Criterios de diagnóstico

Se consideraron casos de EC a las vacas que mostraron MV1, 2 y 3 a partir de los 21 dpp en adelante (Sheldon y col., 2006); de MP, a las que presentaron MV3 y fiebre 5-7 dpp; y por último, de MC, a las que con MV3 no tuvieron fiebre en esos dpp (Sheldon y col., 2006; Smith y col., 1998).

2.4. Análisis de laboratorio

Se seleccionaron al azar las muestras de plasma sanguíneo de 110 y 50 vacas para determinar su concentración de metabolitos y hormonas metabólicas, respectivamente.

2.4.1. Metabolitos

Se determinaron los siguientes metabolitos con reactivos comerciales: los AGNE con el kit NEFA-HR(2)[®] (Wako Chemicals, Richmond, VA 23237, USA), el BHB kit Ranbut RB 1007[®] (Randox Laboratories Ltd, UK), y el NUP con el kit Urea Color-2[®] (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron de 5,7, 6,3 y 6,5%, respectivamente. Los coeficientes de variación inter-ensayo fueron de 7,1, 7,6 y 7,8%, respectivamente. La concentración de metabolitos se expresa en μM para AGNE y BHB, y en mg/dl para el NUP.

2.4.2. Hormonas

Se determinaron las siguientes hormonas (IGF-1, insulina y leptina) mediante RIAs validados previamente descriptos (Becú-Villalobos y col. 2007; Díaz-Torga y

col. 2001; Lacau-Mengido y col. 2000). El RIA de IGF-1 se realizó, previa extracción en etanol-ácido y crio-precipitación, con anticuerpo para IGF-1 (UB2-495, Hormone Distribution Program of the NIDDK). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 7,2, y 8,8%, respectivamente. El RIA de insulina se realizó con anticuerpo anti-insulina bovina (Laboratorios Beta, Buenos Aires, Argentina). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 6,8, y 8,9%, respectivamente. Por último, el RIA de leptina se realizó con el método del doble anticuerpo, con antisuero específico ovino (Delavaud y col. 2002) y leptina recombinante bovina (DS Labs, Webster, Texas, USA, Becú-Villalobos y col. 2007). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 6,7, y 9,0%, respectivamente. La concentración de las hormonas metabólicas se expresa en ng/ml.

2.5. Análisis estadístico

Los datos se muestran como MMC \pm ES. La significación estadística se fijó en $P < 0,05$, y la tendencia en $P < 0,10$. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con mediciones repetidas (en el tiempo) en el que la unidad experimental fue la vaca.

2.5.1. Variables binomiales

Los riesgos de EC, de curación y las variables de eficiencia reproductiva se analizaron con el procedimiento GENMOD de SAS 9.1 (SAS, 2003) mediante el uso de una distribución binomial y de un enlace logit. Los modelos logísticos incluyeron los efectos fijos del número de partos (primíparas vs. multíparas), del tipo de parto (normal vs. anormal [parto anormal incluyó distocia, retención de placenta y mortinato]), de la MET (sin MET vs. MP vs. MC), y de las interacciones de segundo orden. En el caso del modelo que evaluó el riesgo metabólico de EC, se incluyeron

sólo los efectos fijos de la CC, los metabolitos (AGNE, BHB y NUP) y las hormonas metabólicas (IGF-1, insulina y leptina) 14 ± 3 d parto y 6 dpp. Todas las modelizaciones se realizaron mediante el método de eliminación manual de variables con un criterio de exclusión fijado en $P > 0,2$.

2.5.2. Análisis de curvas COR

Los análisis de las curvas COR se realizaron con el Sigmaplot 10.0 (Systat, 2006). La curva COR analiza sensibilidad vs. $1 -$ especificidad. La sensibilidad es la proporción de vacas con EC que tuvieron valores superiores al nivel de corte, mientras que la especificidad es la proporción de vacas sin EC que tuvieron valores inferiores al nivel de corte (Greiner y col., 2000). Como valor de corte se utilizó al punto de la curva COR en el que se alcanzó la mayor sensibilidad y especificidad conjuntas. La interpretación del valor de corte se basó en el ABC. Se consideró que un test diagnóstico no es informativo con un ABC de 0,5; que es preciso con un ABC de 0,5 a 0,7; que es muy preciso con ABC de 0,7 a 0,9; que es altamente preciso con un ABC de 0,9 a 1,0; y finalmente, que es perfecto con un ABC de 1,0 (Swets, 1988). La $RP+$ es la probabilidad de que un valor superior al valor de corte provenga de un animal que posteriormente presentó la enfermedad.

2.5.3. Variables multinomiales

Las mediciones repetidas del MV durante el postparto (21, 31 y 41 dpp) se analizaron como una variable ordinal con el procedimiento GENMOD de SAS 9.1 (SAS, 2003) con una distribución multinomial (i.e.: MV-0, MV-1, MV-2, MV-3) y con un enlace logit acumulativo. El modelo incluyó los efectos fijos del tiempo (21

vs. 31 vs. 41 dpp), del número de partos (primíparas vs. multíparas), del tipo de parto (normal vs. anormal), de la MET (sin MET vs. MP vs. MC) y de las interacciones de segundo orden.

2.5.4. Variables tiempo al evento

Los intervalos entre el parto y la concepción y entre el parto y el refugio hasta los 300 dpp se analizaron con el procedimiento PHREG de SAS 0.1 (SAS, 2003). Los modelos de riesgos proporcionales de Cox incluyeron los efectos fijos previamente descriptos para los modelos logísticos, y la modelización se efectuó con el método de eliminación de variables ya descripto para esos modelos. Los valores de los intervalos de tiempo a la concepción y al refugio (mediana \pm IC 95%) se obtuvieron mediante el análisis de supervivencia de Kaplan – Meier con el procedimiento LIFETEST de SAS 9.1 (SAS, 2003).

2.5.5. Variables continuas

La producción de leche, la CC, los metabolitos y las hormonas metabólicas se analizaron con el procedimiento MIXED de SAS 9.1 (SAS, 2003) como medidas repetidas. El modelo incluyó los efectos aleatorios de la vaca y los efectos fijos del tiempo (d de muestreo en relación al parto) y de los otros efectos previamente descriptos. Se utilizó la estructura de covarianza que produjo el menor criterio de información de Akaike (Littell y col., 2002). Se empleó un contraste polinomial para evaluar los efectos lineales y cuadráticos del tiempo sobre las variables de respuesta, y además, se usó otro contraste para comparar los valores preparto con los postparto.

3. RESULTADOS

3.1. Prevalencia

La prevalencia de EC disminuyó durante el periodo de estudio dado que fue del 54,6% (164/303) a los 21 dpp, del 33,0% (100/303) a los 31 dpp, y finalmente del 14% (45/303) a los 41 dpp.

3.2. Factores de riesgo

En relación con los factores de riesgo clínico de EC se observó que la chance de sufrir la enfermedad fue similar entre primíparas y multíparas, por lo que el número de partos no tuvo ningún efecto sobre la EC ($P=0,398$, Tabla 4.1). Los partos anormales aumentaron dos veces las chances de padecer EC (RP=2,214, IC 95%=1,069-4,586, Tabla 4.1), y la MET tendió a incrementar el riesgo de EC ($P=0,095$) debido fundamentalmente a que las vacas que padecían de MP mostraron el doble de chances de sufrir EC que las que no tenían MET (RP=2,214, IC 95%=1,069-4,586, Tabla 4.1). Con relación a los factores de riesgo metabólico, se determinó que las chances de EC aumentaban a medida que se incrementaban las concentraciones de AGNE en el parto (RP=1,003, IC 95%=1,000-1,005, Tabla 4.1) y de BHB en el postparto (RP=1,001, IC 95%=0,999-1,003, Tabla 4.1); mientras que, por el contrario, el riesgo de EC disminuía cuando aumentaban los niveles preparto de NUP (RP=0,853, IC 95%=0,689-1,058, Tabla 4.1). Los restantes indicadores de BE (preparto y postparto) no tuvieron ningún efecto sobre el riesgo de presentación de EC.

3.3. Análisis de curvas COR

Los AGNE preparto tuvieron un ABC de $0,75 \pm 0,09$ ($P=0,019$), un valor de corte de $456,6 \mu\text{M}$, con una sensibilidad de $0,693$ y una especificidad de $0,875$, y una $\text{RP}+= 5,419$ (Figura 4.1); mientras que los BHB postparto tuvieron un ABC de $0,74 \pm 0,07$ ($P=0,042$), un valor de corte de $402,5 \mu\text{M}$, una sensibilidad de $0,579$ y una especificidad de $0,857$ y una $\text{RP}+= 4,051$ (Figura 4.2). El resto de los metabolitos y hormonas metabólicas mostraron ABC con valores de $P>0.10$.

Tabla 4.1: Modelo logístico de los factores de riesgo de la endometritis clínica en vacas Holando Argentino ($n=303$).

Factores de riesgo ⁽²⁾	de	Incidencia		Endometritis clínica ⁽¹⁾		P
		%	n	RP ⁽³⁾	IC 95% ⁽⁴⁾	
Parición:						0,398
Primíparas		17,8	16/90	Referente	Referente	
Múltiparas		13,6	29/213	0,737	0,343-1,583	
Parto:						0,019
Normal		13,5	35/260	Referente	Referente	
Anormal		23,3	10/43	2,214	1,069-4,586	
Metritis:						0,095
Sin metritis		11,4	21/184	Referente	Referente	
Metritis clínica⁽⁵⁾		13,8	4/29	1,399	0,431-4,356	0,576
Metritis puerperal⁽⁶⁾		22,2	20/90	2,214	1,069-4,586	0,032
AGNE preparto⁽⁷⁾		-	110	1,003	1,000-1,005	0,045
NUP preparto⁽⁸⁾		-	110	0,853	0,689-1,058	0,147
BHB postparto⁽⁹⁾		-	110	1,001	0,999-1,003	0,010

⁽¹⁾Endometritis clínica: vacas que tenían un moco vaginal (MV) que no era claro y normal a los 41 días postparto;

⁽²⁾Factores de riesgo metabólicos con $P>0,2$ fueron excluidos de la tabla;

⁽³⁾RP: razón de probabilidad (del inglés: odds ratio);

⁽⁴⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

- ⁽⁵⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido sin fiebre ($<39,1^{\circ}\text{C}$) 5-7 dpp;
- ⁽⁶⁾Metritis puerperal: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido con fiebre ($\geq 39,1^{\circ}\text{C}$) 5-7 dpp;
- ⁽⁷⁾AGNE: ácidos grasos no esterificados (μM) 14 ± 3 días preparto;
- ⁽⁸⁾NUP: nitrógeno ureico plasmático (mg/dl) 14 ± 3 días preparto;
- ⁽⁹⁾BHB: ácido β -hidroxi-butírico (μM) 6 dpp;
- Las interacciones de segundo orden no tuvieron efecto sobre el riesgo de endometritis ($P>0,10$).

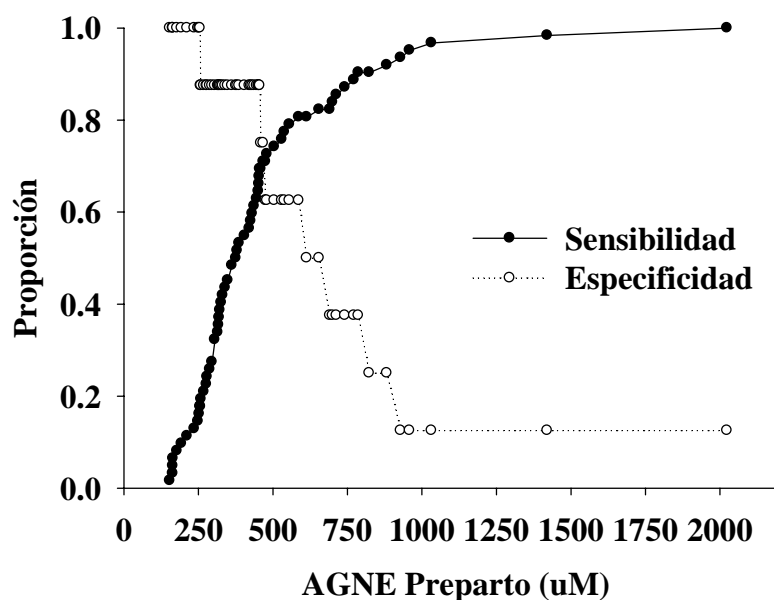


Figura 4.1. Análisis de la eficacia de los ácidos grasos no esterificados (AGNE) 14 días preparto para predecir la endometritis clínica en vacas Holando Argentino (n=110).

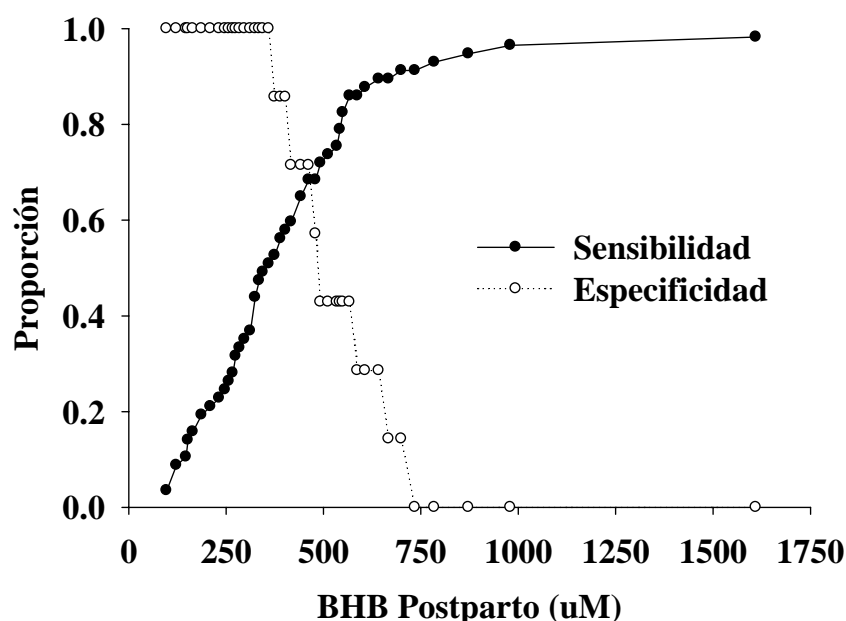


Figura 4.2. Análisis de la eficacia del ácido β -hidroxi-butírico (BHB) 6 días postparto para predecir la endometritis clínica en vacas Holando Argentino (n=110).

3.4. Tiempo postparto y curación

La evolución del MV durante el período postparto se muestra en la Figura 4.3. El modelo de regresión multinomial con medidas repetidas detectó que la probabilidad de cura, definida por la presencia de un MV-0, aumentó a medida que transcurría el tiempo de estudio (dpp, $RP=1,073$, $IC\ 95\%=1,063-1,084$, $P<0,001$). Debido a que el RP para día está sobreestimado (i.e.: 7% de incremento en la tasa de curación por dpp), se utilizó una corrección propuesta por Allison (1999) con la siguiente fórmula: $\beta * p_i (1-p_i)$; β es el coeficiente de la regresión para día [0,0705 ($IC\ 95\% = 0,0608-0,0802$)] y p_i es la probabilidad de cura (0,8289). Finalmente, el cambio corregido en el porcentaje de curación fue de 0,99 (0,86-1,14) por cada día que pasa

durante el postparto (7 - 41 dpp). Por otra parte, la curación también fue afectada por el tipo de parto, debido a que las vacas con partos normales tuvieron más del doble de chance de curarse (i.e.: MV-0) que las que padecieron algún trastorno relacionado al parto (RP=2,557, IC 95%=1,737-3,765, $P<0,001$). El resto de las variables explicativas e interacciones no tuvieron ningún efecto sobre la curación de EC ($P>0,1$).

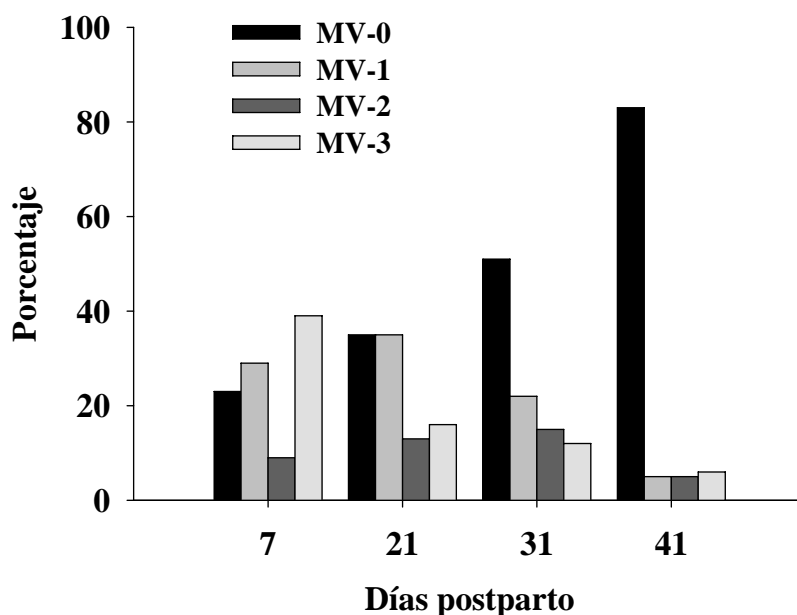


Figura 4.3. Evolución del moco vaginal durante el postparto en vacas Holando Argentino (n=303).

3.5. Efectos reproductivos

3.5.1. Porcentaje de IA a la IATF y tasa de preñez a la IATF

La EC redujo del 79,8 al 2,2% el porcentaje de vacas que recibieron la IATF (RP=0,001, IC 95%=<0,001-0,011, Tabla 4.2) y además ninguna vaca con EC logró

concebir en esa IATF mientras que en las normales la TP-IATF fue del 25,2% (Tabla 4.3).

Tabla 4.2: Modelo logístico de los efectos de la endometritis clínica sobre el riesgo de inseminación artificial a tiempo fijo en vacas Holando Argentino (n=303).

	Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)				<i>P</i>
	%	N	RP ⁽¹⁾	IC 95% ⁽²⁾	
Parición:					0,591
Primíparas	63,3	57/90	Referente	Referente	
Múltiparas	70,4	150/213	0,691	0,180-2,654	
Parto:					0,644
Normal	69,6	181/260	Referente	Referente	
Anormal	60,5	26/43	1,567	0,232-10,574	
Metritis:					0,387
Sin metritis	73,4	135/184	Referente	Referente	
Clínica⁽³⁾	70,0	20/29	5,216	0,250-108,646	
Puerperal⁽⁴⁾	57,8	52/90	0,608	0,167-2,215	
EC:⁽⁵⁾					<0,001
No	79,8	206/258	Referente	Referente	
Si	2,2	1/45	0,001	<0,001-0,011	

⁽¹⁾RP: razón de probabilidad;

⁽²⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽³⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV-3) sin fiebre (<39.1°C) en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁴⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre (≥39.1°C) 5-7 dpp;

⁽⁵⁾EC: endometritis clínica definida como vacas que tenían un moco vaginal (MV) que no era claro y normal a los 41 dpp;

Las interacciones no tuvieron efecto ($P>0.10$).

Tabla 4.3: Modelo logístico de los efectos de la endometritis clínica sobre la chance de preñez a inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en vacas Holando Argentino (n=303).

Tasa de preñez a la IATF					
	%	N	RP ⁽¹⁾	IC 95% ⁽²⁾	P
Parición:					0,738
Primíparas	22,8	13/57	Referente	Referente	
Múltiparas	26,0	39/150	0,873	0,393-1,937	
Parto:					0,487
Normal	26,5	48/181	Referente	Referente	
Anormal	15,4	4/26	0,623	0,164-2,306	
Metritis:					0,238
Sin metritis	28,9	39/135	Referente	Referente	
Clínica⁽³⁾	20,0	4/20	0,639	0,193-2,116	0,46
Puerperal⁽⁴⁾	17,3	9/52	0,460	0,179-1,186	0,10
EC:⁽⁵⁾					&
No	25,2	52/206	Referente	Referente	
Si	0,0	0/1	&	&	

⁽¹⁾RP: razón de probabilidad;

⁽²⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽³⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV-3) sin fiebre (<39.1°C) en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁴⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre (≥39.1°C) 5-7 dpp;

⁽⁵⁾EC: endometritis clínica definida como vacas que tenían un moco vaginal (MV) que no era claro y normal a los 41 dpp;

^(&)No se pudo estimar el riesgo ni la probabilidad asociada a ese riesgo debido a que no concibió ninguna vaca con endometritis al recibir la IATF;

Las interacciones no tuvieron efecto ($P>0.10$).

3.5.2. Tasa de preñez a los 100 dpp y de no preñez a los 200 dpp

El modelo logístico reveló que la facilidad con que se alcanza la preñez disminuye cuando las vacas presentan EC, debido a que la P100 cayó del 34,1% en las vacas sanas al 4,4% en las que tienen EC (RP=0,098, IC 95%=0,022-0,433, Tabla 4.4). Además, también detectó la dificultad de lograr la preñez más a largo plazo en las vacas con EC debido a que la NP200 se incrementó del 14,3% en las sanas al

35,6% en las que sufrieron EC (RP=2,868, IC 95%=1,276-6,448, Tabla 4.5). Finalmente, el porcentaje de refugo reproductivo aumentó del 1,2% en las vacas sanas al 22,2% en las que tenían EC, por lo que el riesgo de refugo reproductivo incrementó marcadamente con la EC (RP=24,286, IC 95%=6,374-92,535, Tabla 4.6).

Tabla 4.4: Modelo logístico del efecto de la endometritis clínica sobre la tasa de preñez a los 100 días postparto en vacas Holando Argentino (n=303).

		Tasa de preñez 100 días postparto			P
	%	N	RP ⁽¹⁾	IC 95% ⁽²⁾	
Parición:					0,190
Primíparas	20,0	18/90	Referente	Referente	
Múltiparas	33,8	72/213	1,640	0,556-4,840	
Parto:					0,195
Normal	31,9	83/260	Referente	Referente	
Anormal	16,3	7/43	0,557	0,230-1,352	
Metritis:					0,003
Sin metritis	37,5	69/184	Referente	Referente	
Clínica⁽³⁾	31,0	9/29	0,849	0,288-2,504	0,586
Puerperal⁽⁴⁾	13,3	12/90	0,189	0,070-0,479	0,001
EC:⁽⁵⁾					0,002
No	34,1	88/258	Referente	Referente	
Si	4,4	2/45	0,098	0,022-0,433	

⁽¹⁾RP: razón de probabilidad (del inglés: odds ratio);

⁽²⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽³⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV-3) sin fiebre (<39.1°C) en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁴⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre (≥39.1°C) 5-7 dpp;

⁽⁵⁾EC: endometritis clínica definida como vacas que tenían un moco vaginal (MV) que no era claro y normal a los 41 dpp;

Las interacciones no tuvieron efecto ($P>0.10$).

Tabla 4.5: Modelo logístico del efecto de la endometritis clínica sobre la tasa de no preñez a los 200 días postparto en vacas Holando Argentino (n=303).

		Tasa de no preñez 200 días postparto			P
	%	N	RP ⁽¹⁾	IC 95% ⁽²⁾	
Parición:					0,810
Primíparas	23,3	21/90	Referente	Referente	
Múltiparas	16,4	35/213	0,902	0,237-3,436	
Parto:					0,626
Normal	17,7	46/260	Referente	Referente	
Anormal	23,3	10/43	1,004	0,388-2,596	
Metritis:					0,144
Sin metritis	16,3	30/184	Referente	Referente	
Clínica⁽³⁾	10,3	3/29	0,569	0,120-2,700	0,477
Puerperal⁽⁴⁾	25,6	23/90	1,929	0,907-4,101	0,088
EC:⁽⁵⁾					0,011
No	14,3	37/258	Referente	Referente	
Si	35,6	16/45	2,868	1,276-6,448	

⁽¹⁾RP: razón de probabilidad (del inglés: odds ratio);

⁽²⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽³⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV-3) sin fiebre (<39.1°C) en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁴⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre (≥39.1°C) 5-7 dpp;

⁽⁵⁾EC: endometritis clínica definida como vacas que tenían un moco vaginal (MV) que no era claro y normal a los 41 dpp;

Las interacciones no tuvieron efecto ($P>0.10$).

Tabla 4.6: Modelo logístico del efecto de la endometritis clínica sobre el riesgo de rechazo reproductivo en vacas Holando Argentino (n=303).

		Refugo reproductivo				
	%	N	RP ⁽¹⁾	IC 95% ⁽²⁾	P	
Parición:					0,111	
Primíparas	6,7	6/90	Referente	Referente		
Múltiparas	3,3	7/213	0,393	0,111-1,312		
Parto:					0,994	
Normal	4,2	11/260	Referente	Referente		
Anormal	4,7	2/43	1,007	0,199-5,091		
Metritis:					0,116	
Sin metritis	3,3	6/184	Referente	Referente		
Clínica ⁽³⁾	10,3	3/29	3,672	0,676-19,947		
Puerperal ⁽⁴⁾	4,4	4/90	4,124	0,932-18,235		
EC: ⁽⁵⁾					<0,001	
No	1,2	3/258	Referente	Referente		
Si	22,2	10/45	24,286	6,374-92,535		

⁽¹⁾RP: razón de probabilidad (del inglés: odds ratio);

⁽²⁾IC 95%: intervalo de confianza del 95%;

⁽³⁾Metritis clínica: vacas con moco vaginal acuoso, purulento o marrón-rojizo y de olor fétido (MV-3) sin fiebre (<39.1°C) en los 5-7 días postparto (dpp);

⁽⁴⁾Metritis puerperal: vacas con MV-3 y con fiebre (≥39.1°C) 5-7 dpp;

⁽⁵⁾EC: endometritis clínica definida como vacas que tenían un moco vaginal (MV) que no era claro y normal a los 41 dpp;

Las interacciones no tuvieron efecto sobre ninguno de los riesgos ($P>0.10$).

3.5.3. Intervalo parto-concepción

El modelo de riesgos proporcionales de Cox reveló que la EC es útil para predecir la rapidez con que se alcanza la preñez, dado que las vacas que sufrieron esta enfermedad mostraron un menor riesgo instantáneo de concebir a los 300 dpp que sus compañeras normales (TRI=0,002, IC 95% =0,000-0,256, $P<0,001$). A su vez, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier detectó que el IPC (Mediana, IC 95%) fue aproximadamente 70 d más largo en las vacas con EC que en las sanas ([Mediana (IC

95%)], 184 (153-233) vs. 115 (102-123) para vacas con y sin EC, respectivamente (Log-Rank test=20,04, grados de libertad=1, $P<0,001$, Figura 4.4).

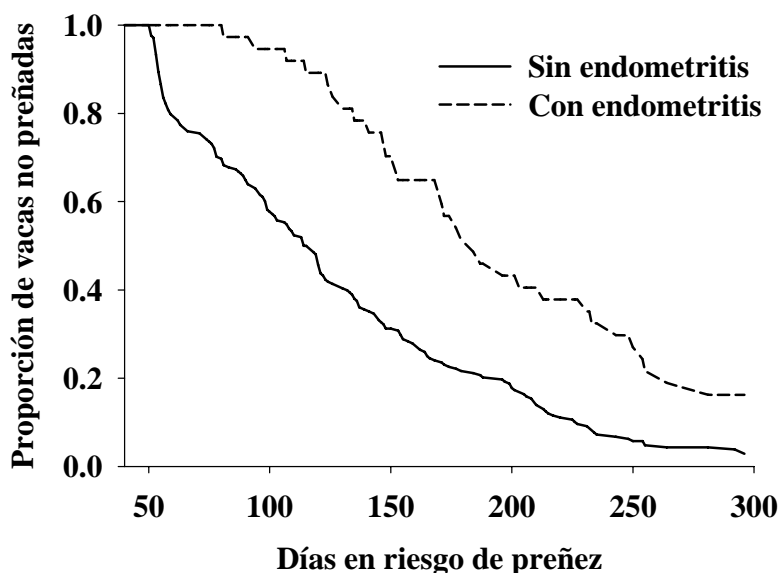


Figura 4.4. Análisis de supervivencia del efecto de la endometritis clínica sobre el intervalo parto-concepción hasta los 300 días postparto en vacas Holando Argentino (n=303).

3.6. Efectos sobre la producción de leche

La EC afectó la producción de leche debido a que las vacas con EC produjeron más que sus compañeras ($27,78 \pm 0,93$ vs. $25,67 \pm 0,41$ kg/d, $P=0,040$, Tabla 4.7 y Figura 4.5). Además, el tiempo (dpp) tuvo efecto sobre la producción ($P<0,001$), que según el contraste fue de tipo cuadrático ($P<0,001$, Tabla 4.5). También hubo una interacción entre el tiempo y el número de partos ($P<0,001$), pues las multíparas dieron más leche al principio (~ 5 kg/d, $P<0,01$) y menos al final de la

lactancia (~ 3 kg/d, $P < 0,01$) que las primíparas (Figura no mostrada). El resto de las interacciones no tuvo efecto sobre la producción ($P > 0,10$).

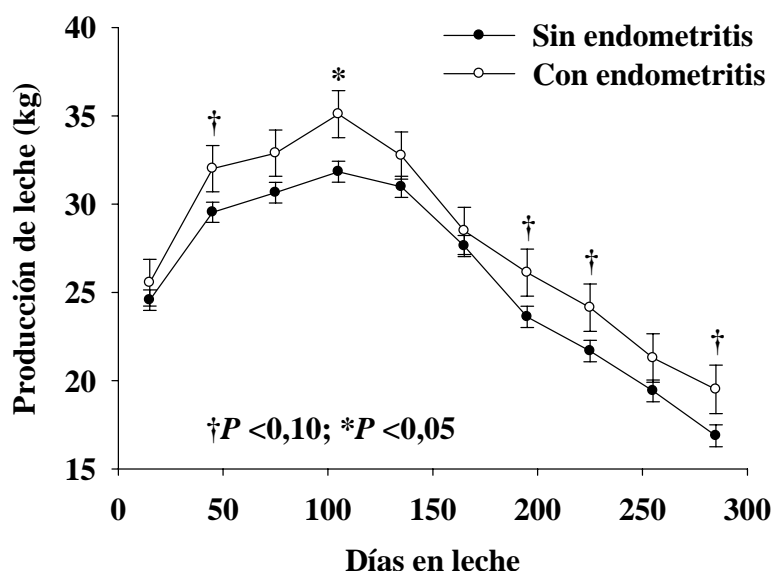


Figura 4.5. Efecto de la endometritis clínica 41 días postparto sobre la producción de leche en vacas Holando Argentino ($n=303$).

3.7. Efectos sobre el balance energético

Las vacas que padecieron EC tuvieron similares valores de CC, de metabolitos y de hormonas metabólicas que las restantes durante el estudio ($P > 0,10$, Tabla 4.7). Además, hubo un efecto de la interacción entre el tiempo (dpp) y la EC sobre las concentraciones de AGNE y de BHB ($P < 0,001$ y $0,065$, respectivamente, Figura 4.6). El tiempo tuvo efectos sobre la CC, el NUP y el IGF-1 ($P < 0,001$, Tabla 4.7). Las primíparas tuvieron menores CC que las multíparas ($2,58 \pm 0,03$ vs. $2,65 \pm 0,03$, $P = 0,029$), también las primíparas mostraron menores concentraciones de AGNE ($548,73 \pm 38,49$ vs. $644,03 \pm 31,67$, $P = 0,019$), y de NUP ($7,75 \pm 0,76$ vs. $11,86 \pm 0,63$,

$P<0,001$) que las multíparas. Contrariamente, las primíparas tuvieron mayores niveles de insulina que las multíparas ($1,62\pm0,12$ vs. $1,28\pm0,15$, $P=0,067$, Tabla 4.7). El efecto del tiempo fue lineal para el NUP ($P<0,001$) y cuadrático para la CC, el BHB y el IGF-1 ($P<0,001$, 0,010, y $<0,001$, respectivamente, Tabla 4.7). Por último, los valores preparto de CC, de NUP, de insulina y de IGF-1 fueron más elevados que los postparto ($P<0,001$, 0,004, 0,021 y $<0,001$, respectivamente, Tabla 4.7), mientras que fueron similares para los AGNE y para el BHB ($P=0,621$ y 0,198, respectivamente).

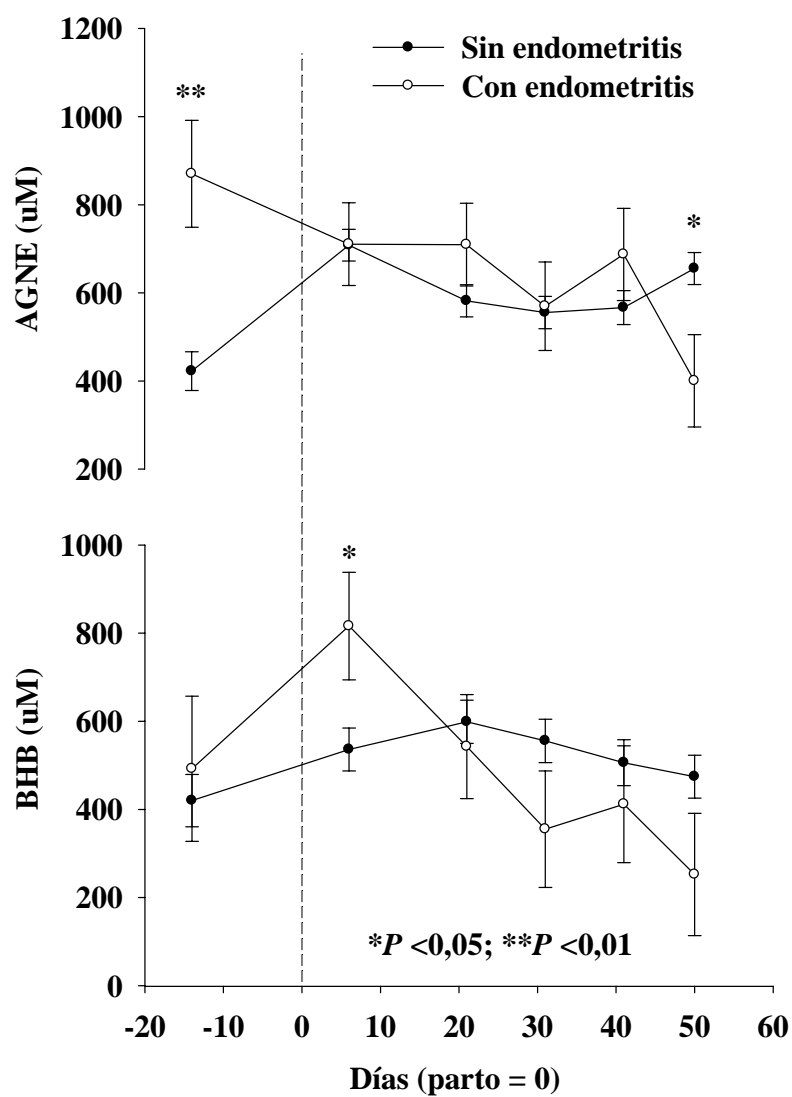


Figura 4.6. Efecto de la endometritis clínica sobre la concentración de ácidos grasos no esterificados (AGNE) y de ácido β -hidroxi-butírico (BHB) en vacas Holando Argentino (n=110).

Tabla 4.7: Efecto de la endometritis clínica sobre la producción de leche y algunos indicadores del estatus metabólico en vacas Holando Argentino (n=303 para leche y condición corporal, n=110 para metabolitos y n=50 para hormonas).

Rolando A. Argente (n=563 para leche y condici3n corporal, n=116 para metabolitos y n=56 para hormonas).									
	EC ⁽¹⁾		Tiempo ⁽²⁾		EC	Tiempo*EC	Lineal	Cuad ⁽³⁾	Pre-Pos ⁽⁴⁾
	No (MMC)	Si (MMC)	(ES)				<i>P</i>		
Leche⁽⁵⁾	25,67	27,78	0,41	<0,001	0,040	0,889	<0,001	<0,001	-
CC⁽⁶⁾	2,63	2,60	0,02	<0,001	0,557	0,937	<0,001	<0,001	<0,001
AGNE⁽⁷⁾	592,67	600,09	21,61	0,107	0,896	<0,001	0,069	0,224	0,610
BHB⁽⁸⁾	514,99	478,22	28,44	0,014	0,606	0,065	0,127	0,010	0,586
NUP⁽⁹⁾	10,19	9,42	0,44	<0,001	0,489	0,439	<0,001	0,428	0,001
IGF-1⁽¹⁰⁾	227,95	283,76	16,92	<0,001	0,214	0,195	<0,001	<0,001	<0,001
Insulina	1,44	1,56	0,10	0,377	0,654	0,301	0,949	0,175	0,658
Leptina	1,65	0,80	0,37	0,495	0,285	0,635	0,917	0,428	0,594

⁽¹⁾EC: endometritis clínica definida por la presencia de un moco vaginal (MV) que no era claro y normal a los 41 dpp;

⁽²⁾Tiempo: días en relación al parto (d: -14, 6, 21, 31, 41 y 50);

⁽³⁾Cuad: contraste para efectos cuadráticos del tiempo;

⁽⁴⁾Pre-Pos: contraste para los valores preparto vs. postparto;

⁽⁵⁾Leche: producción de leche (kg/d), n=303;

⁽⁶⁾CC: condición corporal (escala de 5 puntos), n=303;

⁽⁷⁾AGNE: ácidos grasos no esterificados (μM), n=110;

⁽⁸⁾BHB: ácido β-hidroxi-butírico (μM), n=110;

⁽⁹⁾NUP: nitrógeno ureico en plasma (mg/dl), n=110;

⁽¹⁰⁾IGF-1: factor 1 de crecimiento similar a la insulina (insulin-like growth factor 1) (ng/ml), n=50.

4. DISCUSIÓN

Los objetivos del estudio fueron evaluar los factores de riesgo de la EC, los efectos de la EC sobre la producción de leche y la eficiencia reproductiva y por último, sobre el BE de las vacas lecheras. La prevalencia de EC es similar a la reportada en estudios previos (Gautam y col., 2010a; Ghanem y col., 2002; Le Blanc y col., 2002; Mejía y Lacau-Mengido, 2005; Plontzke y col., 2011; Potter y col., 2010) y disminuye con el paso del tiempo durante el postparto (Gautam y col., 2010a; Plontzke y col., 2011).

4.1. Factores de riesgo

De acuerdo a nuestros datos, los riesgos de EC aumentan con los partos anormales y con la MET, especialmente con la MP. Esto coincide con los trabajos científicos que informan que la distocia, la retención de placenta y la MET son factores preponderantes en el desarrollo de EC (Dubuc y col., 2010a; Gautam y col., 2010a; Ghanem y col., 2002; Le Blanc y col., 2002; Potter y col., 2010). Los partos anormales se asocian con la intervención humana, con las lesiones uterinas y con la contaminación bacteriana, todos elementos que predisponen a las vacas a padecer la EC (Sheldon y col., 2006). Además, las chances de EC se incrementan proporcionalmente con las concentraciones de AGNE y de BHB, por lo que las vacas que están en un BEN más pronunciado serían las más propensas a la enfermedad. Esto último coincide con estudios muy recientes que manifiestan que los AGNE preparto se relacionan con el riesgo de EC (Dubuc y col., 2010b; Kaufmann y col., 2010; Konyves y col., 2009). Es más, incluso los indicadores de BE como los AGNE y el BHB, podrían ser de utilidad para predecir los casos de EC debido a que hemos

determinado que poseen buena sensibilidad (0,69 y 0,58 para AGNE y BHB, respectivamente) y especificidad (0,88 y 0,86 para AGNE y BHB, respectivamente) diagnóstica. En ese sentido, algunos autores han determinado valores de corte para AGNE en el preparto de 0,2 mM (Konyves y col., 2009), 0,3 mM (ABC= 0,66, sensibilidad: 0,38 y especificidad: 0,87, Kaufmann y col., 2010) y 0,5 mM (sensibilidad: 0,54 y especificidad: 0,52, Dubuc y col., 2010b). Por otra parte, estos altos niveles tanto de AGNE preparto como de BHB postparto son indicativos de un BEN que reflejaría una disminución en el consumo de materia seca durante estos momentos (Bell, 1995; Horst y col., 1997). A su vez, este BEN tendría efectos deletéreos sobre la función de los neutrófilos y por tanto, sobre la salud uterina (Hammon y col., 2006).

4.2. Tiempo postparto y curación

Hemos encontrado, además, que la probabilidad de hallar un MV normal aumenta aproximadamente un 1% por cada día que transcurre en el postparto. Este efecto del tiempo sobre la evolución postparto del MV podría considerarse como un indicador del nivel de auto-curación de los animales. Recientemente se ha informado que aproximadamente el 70% de las vacas se recupera de EC de manera espontánea en el período postparto (Dubuc y col., 2011b; Gautam y col., 2010a; Mejía y Lacau-Mengido, 2005; Plontzke y col., 2011). Por lo tanto, nuestro estudio sería el primero que mide objetivamente la tasa diaria de auto-cura de EC en las vacas lecheras. Las vacas que paren normalmente tienen, a su vez, 2,5 veces más chances de presentar un MV normal que las que tuvieron complicaciones al parir. Este hallazgo es de esperar

debido a los riesgos que traen aparejados los partos anormales y que ya hemos mencionado anteriormente.

4.3. Efectos reproductivos

La EC reduce la probabilidad de recibir la IATF y de lograr la preñez en esa inseminación, al mismo tiempo que incrementa (en unos 70 d) el IPC y las chances de refugo reproductivo. Por tanto, nuestros datos soportan los efectos negativos de la EC en la reproducción extensamente reportados en la literatura (Barlund y col., 2008; Dubuc y col., 2010a, 2011b; Fourichon y col., 2000; Gautam y col., 2009, 2010a; Gilbert y col., 2005; LeBlanc y col., 2002; McDougall y col., 2007; Plontzke y col., 2011; Runciman y col., 2008). Existen varios mecanismos para explicar estos efectos deletéreos: primero, por un retraso en el retorno a la ciclicidad postparto observado en las vacas con EC (Mateus y col., 2002; Sheldon y col., 2002b); segundo, por la disminución del tamaño del cuerpo lúteo que sufren las vacas con EC y que lleva a que haya menores concentraciones circulantes de P_4 (Williams y col., 2007); tercero, mediante la perturbación del ambiente intrauterino causada por la inflamación (BonDurant, 1999; Sheldon y Dobson, 2004); y por último, por perjudicar directamente el desarrollo del embrión (Soto y col., 2003).

4.4. Efectos sobre la producción de leche

Las vacas con EC producen aproximadamente 2 kg más de leche / d que las restantes. Este resultado es un tanto inesperado puesto que estudios previos no habían encontrado ninguna relación entre la EC y la producción láctea (Dubuc y col., 2011; Fourichon, 1999). Como se describió anteriormente, las vacas con EC tardan unos 70 d más en preñarse que las sanas (sin EC). Por tanto, esta diferencia hallada en

producción de leche entre ambos grupos podría deberse a un efecto de la gestación sobre la lactancia. Se ha descrito en las ratas que la P₄ (de la preñez) tiene un efecto inhibitorio directo sobre la lactogénesis (López-Fontana y col., 2011), por lo que podría esperarse que se produzca un efecto similar en las vacas lecheras. Es decir, podría especularse que las vacas con EC –que se preñan unos 70 d más tarde- estén menos tiempo bajo ese efecto negativo de la nueva gestación lo que se refleja en una mayor producción láctea que la de sus compañeras sanas que se preñan antes. A su vez, la gestación también podría afectar a la producción de leche de manera indirecta, debido a que la P₄ cambia la prioridad en la partición de nutrientes del organismo, dándole preferencia al útero gestante. Este último, competiría con la glándula mamaria por la captación de los nutrientes circulantes. Bajo este escenario, resulta razonable esperar que las vacas sanas (sin EC), que conciben antes, produzcan menos leche que sus compañeras con EC que conciben más tarde.

4.5. Efectos metabólicos

Por último, la EC no tiene ningún efecto sobre los indicadores del BE debido a que las vacas con y sin la enfermedad presentan similares valores de CC, de concentración de metabolitos (AGNE, BHB y NUP) y de hormonas metabólicas (IGF-1, insulina y leptina). Este es el primer estudio que evalúa estos aspectos debido a que sólo existe un trabajo publicado sobre la asociación de la endometritis subclínica y el BE (Burke y col., 2010). La falta de efecto de la EC sobre el estatus metabólico parece razonable debido a que esta enfermedad está restringida sólo a la mucosa del útero y por tanto, no se acompaña de signos sistémicos como fiebre,

depresión y anorexia (Sheldon y col., 2006). Además, esto último coincidiría con el hecho observado de que no ocasiona pérdidas de producción de leche.

5. CONCLUSIONES

Se concluye que las vacas que padecen problemas al parto, MET y que poseen un BEN más marcado tienen mayor riesgo de desarrollar la EC; que los AGNE y el BHB son útiles para predecir el riesgo de esta enfermedad; que la curación espontánea aumenta un 1% / dpp; que la EC se acompaña de pérdidas reproductivas porque alarga el IPC en unos 70 d e incrementa las chances de refugo; que las vacas con EC producen más leche durante la lactancia que sus compañeras, y finalmente, que la EC no tiene ningún efecto sobre el BE de los animales.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis tuvo cuatro objetivos principales. El primero consistió en evaluar la relación entre los indicadores de BE, el ROP y la ovulación retrasada. El segundo se propuso determinar la asociación entre esos indicadores y el riesgo de presentación de MET y EC. El tercero intentó corroborar si el diagnóstico anticipado de MET y su tratamiento con CEF mejoran la curación y la eficiencia reproductiva, y el último objetivo de la tesis procuró estudiar los efectos de estas dos afecciones uterinas sobre la producción de leche y la eficiencia reproductiva en vacas lecheras de producción comercial. Para resolver estas cuestiones se realizaron 2 experimentos.

En el primer ensayo (capítulo 2) se analizó el rol del BEN en el intervalo de tiempo entre el parto y el ROP, y se verificó si el BEN era un factor de riesgo en los casos de ovulación retrasada. Entre los resultados más destacados se encontró que las vacas que padecen de ovulación retrasada poseen menor CC y mayor nivel de movilización grasa durante el parto, y que el riesgo instantáneo de ROP está en relación directa con la concentración de IGF-1 en el parto y en relación inversa con los niveles de AGNE en el postparto. Además, se constató que el riesgo de sufrir ovulación retrasada se incrementa a medida que se elevan las concentraciones de AGNE antes y después del parto.

En el segundo ensayo (capítulos 3 y 4) se valoró si el BEN desempeña algún papel como factor de riesgo en el desarrollo de MET y de EC y también se

evaluó si ambas enfermedades poseen efectos deletéreos sobre la producción de leche y la eficiencia reproductiva. Se estimó, además, si un diagnóstico anticipado de MET (en la primera semana postparto) acompañado de un tratamiento antibiótico que no deja residuos en leche, resulta de utilidad para reducir las pérdidas productivas asociadas a esta afección.

Con relación a la MET, se determinó que el riesgo de padecerla es mayor en las vacas primíparas, en las que tienen problemas al parto y en las que poseen altos niveles de AGNE y bajos de IGF-1 durante el parto. Además, se demostró que la terapia con CEF no es efectiva contra la MET, puesto que no afecta la curación clínica, la producción de leche, ni la eficiencia reproductiva. Se constató que la tasa de curación guarda relación directa con las concentraciones de insulina, previas y posteriores al parto, y con el tiempo postparto (aumenta ~2.0% por dpp). Asimismo, se confirmó que la cura es mayor cuando la MET no se acompaña de fiebre. Se demostró que la TR y la CC son herramientas diagnósticas precisas, y que los efectos deletéreos sobre la tasa de preñez y el IPC son causados principalmente por la MP, puesto que las vacas con MC se comportan prácticamente igual que las sanas. Finalmente se determinó que la MET posee efectos negativos sobre la producción principalmente al inicio de la lactancia.

En el caso de la EC, se demostró que el riesgo de sufrirla es mayor en las vacas que presentan problemas al parto y/o MET y en las que atraviesan un BEN más marcado. A su vez, se estimó que las concentraciones de AGNE en el parto y de BHB en el postparto son útiles para predecir el riesgo de esta enfermedad. También se midió que la curación espontánea de EC aumenta con el tiempo durante el postparto (~1% / dpp). Por último, se observó fehacientemente

que esta afección causa pérdidas reproductivas por alargar el IPC (~70 d) y por incrementar las chances de rechazo del rodeo, y además que, llamativamente, se acompaña de mayor producción de leche sin afectar el BE de los animales.

En conclusión, podría afirmarse que el BEN es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la ovulación retrasada, de la MET y de la EC, y que los indicadores de BE (i.e.: AGNE y BHB) son útiles para predecir el riesgo de las vacas de padecer estos trastornos a nivel individual. Además, podría considerarse que los problemas al parto (i.e.: distocia y retención de placenta) desempeñan un rol clave en el desarrollo de las dos afecciones uterinas estudiadas, y que el tratamiento antibiótico con CEF no es efectivo contra la MET. Por último, podría expresarse que la MET, especialmente la MP, y la EC poseen efectos deletéreos similares sobre la eficiencia reproductiva, en tanto ejercen acciones contrapuestas sobre la producción de leche debido a que la primera la disminuye marcadamente mientras que la segunda la incrementa levemente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allison PD. Logistic regression using SAS: Theory and application. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 1999.
2. Allison PD. Survival analysis using SAS: A practical guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 1995.
3. Armstrong DG, Gong JG, Webb R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reprod Suppl.* 2003; 61:1-12.
4. Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 2008; 69:714–723.
5. Beam SW, Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil.* 1999; 54:411-424.
6. Beam SW, Butler WR. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.* 1998; 81:121-131.
7. Beam SW, Butler WR. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod.* 1997; 56:133-142.
8. Becú-Villalobos D, García-Tornadú I, Shroeder G, Salado EE, Gagliostro G, Delavaud C, Chilliard Y, Lacau-Mengido IM. Effect of fat

- supplementation on leptin, insulin-like growth factor I, growth hormone, and insulin in cattle. *Can J Vet Res.* 2007; 70:218-225.
9. Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 1995; 73:2804–2819.
 10. Bell MJ, Roberts DJ. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology* 2007; 68:1074–1079.
 11. Benzaquen ME, Risco CA, Archbald LF, Melendez P, Thatcher MJ, Thatcher WW. Rectal temperature, calving-related factors, and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2007; 90:2804-2814.
 12. BonDurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 1999; 77:101-110.
 13. Borghetti P, Saleri R, Mocchegiani E, Corradi A, Martelli P. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; 130:141–162.
 14. Bossaert P, Leroy JLMR, De Vliegher S, Opsomer G. Interrelations Between Glucose-Induced Insulin Response, Metabolic Indicators, and Time of First Ovulation in High-Yielding Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2008; 91:3363–3371.
 15. Bruun J, Ersbøll AK, Alban L. Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 2002; 54:179–190.
 16. Burke CR, McDougall S, Macmillan KL. Effects of breed and calving live weight on postpartum ovarian activity in pasture-fed dairy heifers. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 1995; 55:76–78.

17. Burke CR, Meier S, McDougall S, Compton C, Mitchell M, Roche JR. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2010; 93:5363–5373.
18. Burke CR, Roche JR. Effects of pasture feeding during the periparturient period on postpartum anovulation in grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2007; 90:4304-4312.
19. Canfield RW, Butler RW. Energy balance, first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.* 1991; 69:740-746.
20. Canfield RW, Butler RW. Energy balance and pulsatile luteinizing hormone secretion in early postpartum dairy cows. *Domestic Anim. Endocrinol.* 1990; 7:323-330.
21. Canfield RW, Sniffen CJ, Butler RW. Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1990; 73:2342-2349.
22. Cavestany D, Kulcsar M, Crespi D, Chilliard Y, La Manna A, Balogh O, Keresztes M, Delavaud C, Huszenicza G, Meikle A. Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions. *Reprod Dom Anim.* 2009a; 44:663–671.
23. Cavestany D, Vinales C, Crowe MA, La Manna A, Mendoza A. Effect of prepartum diet on postpartum ovarian activity in Holstein cows in a pasture-based dairy system. *Anim Reprod Sci.* 2009b; 114:1–13.

24. Cavestany D, Blanc JE, Kulcsar M, Uriarte G, Chilbroste P, Meikle A, Febel H, Ferraris A, Krall E. Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J Vet Med A*. 2005; 52:1–7.
25. Chagas LM, Gore PJS, Meier S, Macdonald KA, Verkerk GA. Effect of monopropylene glycol on luteinizing hormone, metabolites, and postpartum anovulatory intervals in primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci*. 2007; 90:1168–1175.
26. Chagas LM, Rhodes FM, Blache D, Gore PJS, Macdonald KA, Verkerk GA. Precalving effects on metabolic responses and postpartum anestrus in grazing primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci*. 2006; 89:1981–1989.
27. Chenault JR, McAllister JF, Chester ST, Dame KJ, Kausche FM, Robb EJ. Efficacy of ceftiofur hydrochloride sterile suspension administered parenterally for the treatment of acute postpartum metritis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 2004; 224:1634-1639.
28. Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev*. 1998; 38:131-152.
29. Cissé M, Chilliard Y, Coxam V, Davicco MJ, Rémond B. Slow release somatotropin in dairy heifers and cows fed two levels of energy concentrate. 2. Plasma hormones and metabolites. *J Dairy Sci*. 1991; 74:1382-1394.
30. Clark CEF, Fulkerson WJ, Nandra KS, Barchia I, MacMillan KL. The use of indicators to assess the degree of mobilization of body reserves in dairy

- cows in early lactation on a pasture-based diet. *Livest Prod Sci.* 2005; 94:199–211.
31. Correa MT, Erb H, Scarlett J. Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 1993; 76:1305–1312.
 32. Daftary SS, Gore AC. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med.* 2005; 230:292-306.
 33. Darwash AO, Lamming GE, Woolliams JA. The phenotypic association between the interval to post-partum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle. *Anim. Sci.* 1997; 65:9–16.
 34. Delavaud C, Ferlay A, Faulconnier Y, Bocquier F, Kann G, Chilliard Y. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J Anim Sci.* 2002; 80:1317-1328.
 35. De Vries MJ, Veerkamp RF. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *J. Dairy Sci.* 2000; 83:62-69.
 36. Díaz-Torga GS, Mejía ME, González-Iglesias A, Formía N, Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido IM. Metabolic cues for puberty onset in free grazing Holstein heifers naturally infected with nematodes. *Theriogenology* 2001; 56:111-122.
 37. Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 78:345-370.
 38. Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2011a; 94:1339–1346.

39. Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2011b; 94:1325–1338.
40. Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2010; 93:5764–5771.
41. Drillich M, Beetz O, Pfutzner A, Sabin M, Sabin HJ, Kutzer P, et al. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy reproductive cows. *J. Dairy Sci.* 2001; 84:2010–2017.
42. Drillich M, Voigt D, Forderung D, Heuwieser W. Treatment of Acute Puerperal Metritis with Flunixin Meglumine in Addition to Antibiotic Treatment. *J. Dairy Sci.* 2007; 90:3758–3763.
43. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farve T, Webster G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 1989; 72:68–78.
44. Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1994; 77:2695–2703.
45. Foldi J, Kulcsar M, Pecsí A, Huyghe B, de Sa C, Louis JA. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 96:265–281.
46. Fourichon C, Seegers H, Bareille N, Beaudeau F. Effects of disease on milk production in the dairy cow: A review. *Prev. Vet. Med.* 1999; 41:1–35.

47. Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 2000; 53:1729–1759.
48. Francisco CC, Spicer LJ, Payton ME. Predicting cholesterol, progesterone, and days to ovulation using postpartum metabolic and endocrine measures. *J Dairy Sci.* 2003; 86:2852-2863.
49. Gautam G, Nakao T, Koike K, Long ST, Yusuf M, Ranasinghe RM, Hayashi A. Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology* 2010a; 73:168–179.
50. Gautam G, Nakao T, Yamada K, Yoshida C. Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. *Theriogenology* 2010b; 73:180-189.
51. Gautam G, Nakao T, Yusuf M, Koike K. Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. *Anim. Reprod. Sci.* 2009; 116:175–187
52. Ghanem M, Shalaby AH, Sharawy S, Saleh N. Factors leading to endometritis in dairy cows in Egypt with special reference to reproductive performance. *J. Reprod. Dev.* 2002; 48:371-375.
53. Gilbert RO. Uterine disease in the postpartum period. In: *Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction*. Porto Seguro, Brazil, 8-12 August, 2004; p.66–73.

54. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2005; 64:1879–1888.
55. Goff JP, Horst RL. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 1997; 80:1260-1268.
56. González-Parra S, Argente J, Chowen JA, Van Kleffens M, van Neck JW, Lindenbeigh-Kortleve DJ, Drop SL. Gene expression of the insulin-like growth factor system during postnatal development of the rat pituitary gland. *J Neuroendocrinol.* 2001; 13:86–93.
57. Grainger C, Wilhelms GD. Effect of duration and pattern of underfeeding in early lactation on milk production and reproduction of dairy cows. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 1979; 19:395–401.
58. Grainger C, Wilhelms GD, McGowan AA. Effect of body condition at calving and level of feeding in early lactation on milk production of dairy cows. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 1982; 22:9–17.
59. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med.* 2000; 45:23–41.
60. Gröhn YT, Erb HN, McCulloch CE, Saloniemi HS. Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: Associations among host characteristics, disease and production. *Prev.Vet. Med.* 1990; 8:25–39.
61. Grummer RR. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci.* 1995; 73:2820-2833.

62. Hadley JS, Hinds CJ. Anabolic strategies in critical illness. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; 2:700-707
63. Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; 113:21–29.
64. Harrison RO, Ford SP, Young JW, Conley AJ, Freeman AE. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 1990; 73:2749-2758.
65. Heng TS, Chidgey AP, Boyd RL. Getting back at nature: understanding thymic development and overcoming its atrophy. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10:425-433.
66. Hoedemaker M. Postpartal pathological vaginal discharge: To treat or not to treat? *Reprod. Dom. Anim.* 1998; 33:141-146.
67. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA, Buxton DR. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1997; 80:1269–1280.
68. Hossein-Zadeh NG, Ardalan M. Cow-specific risk factors for retained placenta, Metritis and clinical mastitis in Holstein cows. *Vet. Res. Commun.* 2011; 35:345–354.
69. Huzzey JM, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MAG. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J. Dairy Sci.* 2007; 90:3220–3233.
70. Kaneene JB, Miller R. Risk factors for metritis in Michigan dairy cattle using herd- and cow-based modelling approaches. *Prev. Vet. Med.* 1995; 23:183–200.

71. Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Heuwieser W. Correlations between periparturient serum concentrations of non-esterified fatty acids, betahydroxybutyric acid, bilirubin, and urea and the occurrence of clinical and subclinical postpartum bovine endometritis. *BMC Veterinary Research* 2010; 6:47-52.
72. Kawashima C, Sakaguchi M, Suzuke T, Sasamoto Y, Takahashi Y, Matsui M, Miyamoto A. Metabolic profiles in ovulatory and anovulatory primiparous dairy cows during the first follicular wave postpartum. *J Reprod Dev.* 2007; 53:113-120.
73. Kelley KW, Weigent DA, Kooijmann R. Protein hormones and immunity. *Brain Behav. Immun.* 2007; 21:384–392.
74. Konyves L, Szenci O, Jurkovich V, Tegzes L, Tirian A, Solymosi N, Gyulay G, Brydl E. Risk assessment of postpartum uterine disease and consequences of puerperal metritis for subsequent metabolic status, reproduction and milk yield in dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica* 2009; 57:155-169.
75. Lacau-Mengido IM, Mejía ME, Díaz-Torga GS, Gonzalez-Iglesias A, Formía N, Libertun C, Becú-Villalobos D. Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. *J. Anim. Sci.* 2000; 78:817–824.
76. Lacetera N, Scalia D, Franci O, Bernabucci U. Effects of non-esterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 2004; 87:1012-1014.

77. Lam TKT, Schwartz GJ, Rossetti L. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature Neuroscience* 2005; 8:579-584.
78. LeBlanc S. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Vet. J.* 2008; 176:102-114.
79. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2002; 85:2223–2236.
80. Li L, Fu YC, Xu JJ, Chen XC, Lin XH, Luo LL. Caloric restriction promotes the reproductive capacity of female rats via modulating the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). *General and Comparative Endocrinology* 2011; 174:232–237.
81. Littell RC, Stroup WW, Freund RJ. *SAS for Linear Models*, 4th ed. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2002.
82. López-Fontana CM, Maselli ME, Salicioni AM, Carón RW. The inhibitory effect of progesterone on lactogenesis during pregnancy is already evident by mid- to late gestation in rodents. *Reprod. Fertil. Dev.* 2011; <http://dx.doi.org/10.1071/RD11160>.
83. Lucy MC. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Reprod. Suppl.* 2007; 64:237–254.
84. Macmillan KL. Advances in bovine theriogenology in New Zealand. 1. Pregnancy, parturition and the postpartum period. *N. Z. Vet. J.* 2002; 50:67–73.

85. Markusfeld, O. Factors responsible for post parturient metritis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 1984; 114:539.
86. Markusfeld O. Periparturient traits in seven high dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *J. Dairy Sci.* 1987; 70:158.
87. Mateus L, da Costa LL, Bernardo F, Silva JR. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 2002; 37:31-35.
88. McDougall S, Burke CR, Williamson NB, Macmillan KL. The effect of stocking rate and breed on the period of postpartum anoestrus in grazing dairy cattle. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 1995; 55:236–238.
89. McDougall S, Macaulay R, Compton C. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 99:9–23.
90. McNaughton LR, Verkerk GA, Parkinson TJ, Macdonald KA, Holmes CW. Postpartum anoestrous intervals and reproductive performance of three genotypes of Holstein-Friesian dairy cattle managed in a seasonal pasture-based dairy system. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 2003; 63:77–81.
91. Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilbroste P. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 2004; 127:727-737.

92. Mejía ME, Lacau-Mengido IM. Endometritis treatment with a PGF₂a analog does not improve reproductive performance in a large dairy herd in Argentina. *Theriogenology* 2005; 63:1266-1276.
93. Naftolin F, García-Segura LM, Horvath TL, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, Leranth C, Vondracek-Klepper S, Lewis C, Chang A, Parducz A. Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reproductive Sciences* 2007; 14:101-117.
94. NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7 revised edition, National Academic Press, Washington DC, USA, 2001.
95. O'Connor JC, McCusker RH, Strle K, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW. Regulation of IGF-I Function by Proinflammatory Cytokines: At the Interface of Immunology and Endocrinology. *Cell Immunol.* 2008; 252: 91–110.
96. Olson JD, Ball L, Mortimer RG, Farin PW, Adney WS, Huffman EM. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45:2251–2255.
97. Olson JD, Bretzlaff K, Mortimer RG, Ball L. The metritis-pyometra complex. In: *Current Therapy in Theriogenology*. Morrow DA, ed. W.B. Saunders, Co., Philadelphia, PA, USA, 1986, p. 227.
98. Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing cows in Belgium: A field study. *Theriogenology* 2000; 53:841–857.

99. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeast United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.* 2010a; 93:546–554.
100. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J Dairy Sci.* 2010b; 93:1596-1603.
101. Overton TR, Waldron MR. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J Dairy Sci.* 2004; 87:E105-E119.
102. Plontzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Heuwieser W, Drillich M. Prevalence of clinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Reprod. Dom. Anim.* 2011; 46:520-526.
103. Potter TJ, Guitian J, Fishwick J, Gordon PJ, Sheldon IM. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 2010; 74:127–134.
104. Rajala PJ, Grohn YT. Effects of dystocia, retained placenta, and metritis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1998; 81:3172–3181.
105. Refsdal AO. To treat or not to treat: a proper use of hormones and antibiotics. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:109–119.
106. Reist M, Erdin DK, von Euw D, Tschumpelin KM, Leuenberger H,

- Mannon HM, et al. Use of threshold serum and milk ketone concentrations to identify risk for ketosis and endometritis in high – yielding dairy cows. *AJVR* 2003; 64:186-194.
107. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J. Dairy Sci.* 2003; 86:1876–1894.
 108. Roche JR, Macdonald KM, Burke CR, Lee JM, Berry DP. Associations among body condition score, body weight, and reproductive performance in seasonal-calving dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2007; 90:376–391.
 109. Runciman DJ, Anderson GA, Malmö J, Davis GM. Use of postpartum vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance. *Aust. Vet. J.* 2008; 86:205–213.
 110. SAS. SAS and STAT User's Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 2003.
 111. Senatore EM, Butler WR, Oltenacu PA. Relationship between energy balance and postpartum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. *J Anim Sci.* 1996; 62:17-23.
 112. Sheldon IM, Bushnell M, Montgomery J, Rycroft AN. Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infection in cattle. *Vet. Rec.* 2004; 155:383–387.
 113. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 82–83:295–306.
 114. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum

- uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006; 65:1516-1530.
115. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet. Rec.* 2002a; 151:531–534.
 116. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 2002b; 123:837–845.
 117. Smith BI, Donovan GA, Risco CA, Littell R, Young C, Stanker LH. Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. *J. Dairy Sci.* 1998; 81:1555–1562.
 118. Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Actions of tumor necrosis factor-alpha on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003; 50:380–388.
 119. Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal luteinizing hormone induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci.* 1995; 73:3719–3731.
 120. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988; 240:1285–1293.
 121. Systat. Sigmaplot User's Guide, version 10.0. Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA, 2006.

122. Thatcher WW, Wilcox CJ. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J Dairy Sci.* 1973; 56:608-615.
123. Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Maes D, Coryn M, de Kruif A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Anim Reprod Sci.* 2004; 87:33–44.
124. Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Dom Anim Endocrinol.* 2008; 35:325–342. Schillo KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 1992; 70:1271–1282.
125. Thatcher WW, Wilcox CJ. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 1973; 56:608-615.
126. Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. Win EPISCOPE 2.0: Improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 2001; 148:567–572.
127. Urton G, von Keyserlingk MAG, Weary DM. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J. Dairy Sci.* 2005; 88:2843–2849.
128. Waldron MR. Periparturient immunosuppression – what we know and what we don't. 21st Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium 2011. pp. 1-15. Tampa, FL, USA.
129. Wathes DC, Taylor VJ, Cheng Z, Mann GE. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reprod. Suppl.* 2003; 31:219-237.

130. Williams EJ, Fischer DP, England GCW, Dobson H, Pfeiffer DU, Sheldon IM. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the inflammatory response to endometritis in cattle. *Theriogenology* 2005; 63:102–117.
131. Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GCW, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 2007; 68:549–559.
132. Wittrock JM, Proudfoot KL, Weary DM, von Keyserlingk MAG. Metritis affects milk production and cull rate of Holstein multiparous and primiparous dairy cows differently. *J. Dairy Sci.* 2011; 94:2408–2412.
133. Zhou C, Boucher JF, Dame KJ, Moreira M, Graham R, Nantel J, Zuidorf S, Arfi L, Flores R, Neubauer G, Olson J. Multilocation trial of ceftiofur for treatment of postpartum cows with fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001; 219:805–808.
134. Zwald AG, Ruegg PL, Kaneene JB, Warnick LD, Wells SJ, Fossler C, Halbert LW. Management Practices and Reported Antimicrobial Usage on Conventional and Organic Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 2004; 87:191-201.

BIOGRAFÍA PERSONAL

El Médico Veterinario Mauricio Javier Giuliodori nació el 14 de agosto de 1969 en la ciudad de 25 de Mayo, provincia de Buenos Aires, Argentina. Realizó sus estudios secundarios en la Escuela Agrotécnica Salesiana Carlos M. Casares en Del Valle, 25 de Mayo, provincia de Buenos Aires, Argentina. Ingresó a la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la UNLP en Marzo de 1989 y obtuvo el título de Médico Veterinario en abril de 1994. Ese año contrajo matrimonio con Laura y es padre de Muriel y de Luisina. Entre los años 1994 y 1999 consiguió, por concurso, las becas de Iniciación en la Investigación Científica y Tecnológica, y de Perfeccionamiento en la Investigación Científica y Tecnológica, ambas otorgadas por la UNLP. Además, se ha desempeñado como Auxiliar Diplomado en las Cátedras de Fisiología y de Patología Médica, y como Jefe de Trabajos Prácticos de Fisiología en la FCV-UNLP. Actualmente es Profesor Adjunto interino de la Cátedra de Fisiología y Jefe de Trabajos Prácticos ordinario de la Cátedra de Enfermedades de Rumiantes y Cerdos de esta Facultad. También es miembro regular de la American Physiological Society (USA) y de la Sociedad Argentina de Fisiología. En 2005 recibió el premio Teaching Career Enhancement Award y en 2008 el Teaching Section New Investigator Award, ambos otorgados por la American Physiological Society (USA). Por último, desde hace unos años ha estudiado la relación entre la nutrición y la reproducción en las vacas lecheras, área en la que continuará trabajando una vez alcanzado el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.